

CÉLULAS ASESINAS NATURALES MODIFICADAS Y MÉTODOS RELACIONADOS**Campo de la Invención**

5 [0001] La invención se refiere a células asesinas naturales (NK) modificadas y a métodos para preparar poblaciones de células NK modificadas.

Referencia Cruzada a Solicitudes Relacionadas

10 [0002] Esta solicitud reclama el beneficio de la solicitud de patente provisional de los Estados Unidos de América núm. 63/477,785, presentada el 29 de diciembre de 2022, la cual se incorpora por la presente como referencia en su totalidad.

Incorporación como Referencia de Material Electrónicamente**Presentado**

15 [0003] Se incorpora como referencia en su totalidad un listado de secuencias de nucleótidos/aminoácidos leíbles por computadora presentada concurrentemente con la presente e identificada como sigue: Archivo de 58.824 bytes denominado "57819P_Seqlisting.XML"; creado el 18 de diciembre de 2022.

Antecedentes de la Invención

20 [0004] La modificación de células inmunitarias derivadas de pacientes para expresar receptores de antígeno quimérico (CAR) ha alterado el panorama de las terapias celulares adoptivas, proporcionando a los científicos y médicos la capacidad de aprovechar las poderosas capacidades citolíticas
25 de las células inmunitarias y dirigirlas a dianas específicas

que expresan antígeno de una manera independiente de MHC. Las células asesinas naturales (NK), que surgen a través del linaje linfoide, son parte del sistema inmunitario innato y son atractivos para la terapia celular adoptiva, puesto que se ha encontrado que detectan y aniquilan ciertos tipos de células tumorales. Las fuentes habituales de células NK incluyen células NK de sangre periférica (PB-NK), células NK de sangre de cordón umbilical y líneas celulares NK, tal como NK-92. En tanto que son prometedoras, estas fuentes padecen de inestabilidad genética, citotoxicidad inconsistente, expansión limitada, heterogeneidad del producto y/o inmunogenicidad de hospedador. Existe la necesidad en la técnica de terapias basadas en células NK mejoradas para abordar las limitaciones de las opciones de terapia actuales.

Breve Descripción de la Invención

[0005] La divulgación proporciona una población de células asesinas naturales (NK) derivados de células madre pluripotentes. La divulgación proporciona además una población de células NK modificadas, en donde las células NK expresan al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consta de antígeno de leucocitos humanos E (HLA-E), antígeno de leucocitos humanos F (HLA-F), y antígeno de leucocitos humanos G (HLA-G). Las células NK también comprenden una alteración genéticamente modificada de una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de β -2 microglobulina endógena

(B2M) y/o una alteración genéticamente modificada de una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de un gen relacionado con el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II seleccionado del grupo que consta de proteína que
5 contiene anquirina asociada al factor X regulador (RFXANK), factor 5 regulador (RFX5), proteína asociada al factor X regulador (RFXAP) y transactivador de clase II (CIITA). Por ejemplo, las células NK comprenden una alteración genéticamente modificada de B2M y RFXANK endógenos, y
10 expresan HLA-E. En otro ejemplo, las células NK comprenden una alteración genéticamente modificada de todas las copias de B2M endógeno y todas las copias de RFXANK, y expresan HLA-E. En diversos aspectos, las células NK comprenden además una molécula de ácido nucleico que codifica para un producto
15 génico suicida (por ejemplo, un gen suicida de timidina cinasa (TK) de virus de herpes simple). Las células NK se derivan opcionalmente de células madre pluripotentes (por ejemplo, células madre embrionarias o células madre pluripotentes inducidas), y opcionalmente expresan uno o más
20 marcadores de superficie celular seleccionados del grupo que consta de CD56, CD45, CD25, DNAM-1, NKp30, NKG2D, y NKp44. Opcionalmente, las células NK expresan además un receptor de antígeno quimérico (CAR); un receptor Fc (FcR); o un receptor NKG2D no natural (ver, por ejemplo, la patente de Estados
25 Unidos de América núm. 10,259,858, y la publicación de

patente de Estados Unidos de América núm. 2020/0138866), que, en algunos aspectos, es capaz de unirse a una molécula biespecífica basada en anticuerpos (por ejemplo, un MicAbody); u otro tipo de receptor.

5 **[0006]** La divulgación proporciona además un método para producir células NK derivadas de células madre pluripotentes en condiciones libres de alimento, opcionalmente libres de suero. El método comprende (a) cultivar células madre pluripotentes (PSC), opcionalmente genéticamente modificadas para interrumpir una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de B2M y/o una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de un gen relacionado con HLA de clase II seleccionado del grupo que consta de RFXANK, RFX5, RFXAP, y CIITA, y opcionalmente expresar una proteína HLA de clase I, por ejemplo, HLA-E; (b) diferenciar las células madre pluripotentes en células precursoras (por ejemplo, usando cuerpos embrioides) capaces de diferenciarse en tipos de células hematopoyéticas, tipos de células endoteliales, y/o derivados mesodérmicos; y (c) diferenciar las células precursoras en células NK en condiciones libres de alimentador, opcionalmente libres de suero, en un medio de cultivo que comprende uno o más de SCF, IL-7, IL-15, y Flt3L. Opcionalmente, el medio de cultivo del paso (c) comprende además un derivado de pirimido [4,5-b]indol tal como dihidrobromuro de (1r,4r)-N1-(2-bencil-7-(2-metil-2H-

10

15

20

25

tetrazol-5-il)-9H-pirimidol[4,5-b]indol-4-il)ciclohexano-1,4-diamina dihidratado ("UM171"). En diversos aspectos, el PSC es un PSC humano. En otros diversos aspectos, el método comprende además (d) cultivar las células NK en un medio de cultivo que comprende IL-15 e IL-18 (y, opcionalmente, IL-21), y en la presencia de un anticuerpo o ligando que se une a un receptor en células NK para promover la activación y expansión de las células NK. En un aspecto, el anticuerpo o ligando se une a un receptor seleccionado del grupo que consta de DNAM-1, OX40, NKG2D, 2B4, NKp30, y NKp46. Se puede incluir una combinación de anticuerpos o ligandos que se unen a diferentes dianas seleccionadas de DNAM-1, OX40, NKG2D, 2B4, NKp30, y NKp46 en el paso (d). Por ejemplo, el paso (d) puede comprender cultivar las células NK en la presencia de un anticuerpo que se une a NKp30 y/o un anticuerpo que se une a DNAM-1.

[0007] La divulgación también proporciona un método para tratar una enfermedad en un sujeto en necesidad de esto, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la población de células NK, tratando de esta manera la enfermedad en el sujeto. En algunos aspectos de la divulgación, la enfermedad es cáncer. Opcionalmente, una o más citocinas, tal como IL-15 y/o IL-2, se administran al sujeto antes de, durante, o después de administrar la población de células NK. También opcionalmente, una o más

constructos de anticuerpo se administran al sujeto antes de, durante, o después de administrar la población de células NK.

[0008] En tanto que varias modalidades en la especificación se presentan usando un lenguaje "que comprende", bajo diversas circunstancias, una modalidad relacionada también se puede describir usando un lenguaje "que consta de" o "que consta esencialmente de". La divulgación contempla modalidades descritas como "que comprende" una característica para incluir modalidades que "constan de" o "constan esencialmente de" la característica. El término "uno" o "una" se refiere a uno o más. Como tal, los términos "uno" (o "una"), "uno o más" y "al menos uno" se pueden utilizar indistintamente en la presente. Se debe entender que el término "o" abarca elementos en la alternativa o juntos salvo que el contexto lo requiera inequívocamente de otra manera.

[0009] La cita de intervalos de valores en la presente se propone simplemente que sirva como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que cae dentro del intervalo y cada punto final, salvo que se indique lo contrario en la presente, y cada valor y punto final separado se incorpora en la especificación como si se citara individualmente en la presente. Sin embargo, la descripción también contempla los mismos intervalos en los que se excluye el punto final más bajo y/o más alto. Cuando el término

"aproximadamente" se usa en relación con un número numérico o valor general, significa el número o valor citado más o menos 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, o 15%, incluyendo todos los valores dentro de este intervalo, de ese número o valor citado. La
5 variación real propuesta es determinable a partir del contexto.

[00010] Todos los métodos descritos en la presente se pueden realizar en cualquier orden adecuado salvo que se indique lo contrario en la presente o se contradiga
10 claramente por el contexto. El uso de cualquiera y todos los ejemplos, o lenguaje de ejemplo (por ejemplo, "tal como") proporcionado en la presente, se propone simplemente que ilumine mejor la divulgación y no plantea una limitación en el alcance de la divulgación salvo que se reivindique lo
15 contrario. Sólo estas limitaciones que se describen en la presente como críticas para la invención deben verse como tal; las variaciones de la invención que carecen de limitaciones que no se han descrito en la presente como críticas se proponen como aspectos de la invención.

20 [00011] Serán evidentes características y variaciones adicionales de la invención para aquellos expertos en la técnica a partir de la totalidad de esta solicitud, incluyendo las figuras y la descripción detallada, y todas estas características se propone que sean aspectos de la
25 invención. De manera similar, las características de la

la invención descritas en la presente se pueden recombinar en modalidades adicionales que también se proponen como aspectos de la invención, independientemente de si la combinación de características se especifica como un aspecto o modalidad de la invención. Se propone que todo el documento se relacione como una divulgación unificada, y se debe entender que se contemplan todas las combinaciones de características descritas en la presente (incluso si se describen en secciones separadas), incluso si la combinación de características no se encuentran juntas en la misma oración, o párrafo, o sección de este documento.

Breve Descripción de las Figuras

[00012] La figura 1 representa un esquema representativo para un proceso de diferenciación de NK descrito en la presente: Paso 0 - Cultivo PSC; Paso 1 - Diferenciación hematopoyética; Paso 2 - Diferenciación de NK; Paso 3A - Activación de NK; y Paso 3B - Expansión de NK. Los pasos 0-3B se mencionan en las descripciones de figura a continuación.

[00013] Las figuras 2A-2C son gráficas de barras que ilustran el rendimiento celular (figura 2A), el porcentaje de células CD56⁺CD45⁺ (figura 2B) y la viabilidad celular (figura 2C) que resultan del método de producción de células NK modificadas derivadas de PSC humanas (células FcR-UDC I-NK) descritas en la presente. La barra en la izquierda de cada gráfica representa condiciones que no incluyeron UM171, y la

barra en la derecha en cada gráfica representa condiciones en donde UM171 35 nM estaba presente.

[00014] Las figuras 3A-3D son gráficas de barras que ilustran el rendimiento del paso 2 (Diferenciación de NK) y la expansión de las células NK a través de múltiples clones editados por genes (figuras 3A-3B) y líneas celulares de PSC (figuras 3C-3D). En las figuras 3A-3B, las células NK se derivaron de la línea celular de NIH3 de PSC (tipo silvestre) o líneas celulares PSC NIH3 genéticamente modificadas: UDC I-PSC, FcR-UDC I-PSC, y UDC I/II-PSC. En las figuras 3C-3D, las células NK se derivaron de líneas celulares de PSC de NIH3 y W1C1 que se modificaron genéticamente (UDC I-PSC y UDC I/II-PSC) o línea celular de NIH3 parental (tipo silvestre).

[00015] La figura 4 es una gráfica que ilustra los efectos de varias combinaciones de agonistas de receptor de NK en la activación de células CD56+, como se mide por la expresión de CD215/IL-15Ra (panel izquierdo) o CD25/IL-2Ra (panel derecho).

[00016] Las figuras 5A-5B son gráficos de línea que ilustran (figura 5A) expansión en veces acumulativa y (figura 5B) viabilidad celular después del paso 3A y el paso 3B del proceso de diferenciación de NK (ilustrado en la figura 1) que prueba diferentes densidades celulares sembradas al comienzo del paso 3A. Las células NK se generaron a partir de NIH3 UDC I-PSC utilizando el método descrito en la presente.

[00017] La figura 6 es una gráfica que compara los tamaños celulares de células NK derivadas de PSC usando el método descrito en la presente ("iPSC") y células NK de sangre periférica ("PBNK") como se determina por citometría de flujo. Las células NK derivadas de PSC usando el método descrito en la presente fueron en promedio aproximadamente 18% más grandes en tamaño (en volumen) en comparación a las células NK aisladas de sangre periférica.

[00018] Las figuras 7A-7E son gráficas de barras del fenotipo esperado de células NK derivadas de diferentes clones editados por genes: NIH3 tipo silvestre y NIH3 UDC I-PSC, FcR-UDC I-PSC, y UDC I/II-PSC modificado. El asterisco indica que no se recopilieron datos.

[00019] Las figuras 8A-8D son gráficas de barras del fenotipo esperado de células NK derivadas de diferentes líneas celulares: NIH3 y W1C1 tipo silvestre, y clones editados por genes UDC I-PSC y UDC I/II-PSC modificados. El asterisco indica que no se recopilieron datos.

[00020] Las figuras 9A-9C son gráficas de barras que ilustran la expresión de marcadores de células NK y T comunes en células FcR-UDC I-NK (paso 2 (barra izquierda para cada marcador) y paso 3 (barra media para cada marcador)) derivadas de FcR-UDC I-PSC modificada en comparación a PB-NK expandida (barra derecha para cada marcador). Los pasos 2 y 3 se ilustran en la figura 1.

[00021] Las figuras 10A-10C son gráficas de barras que ilustran la expresión de marcadores comunes de activación, agotamiento, y "tipo memoria" en células FcR-UDC I-NK (paso 2 (barra izquierda para cada marcador) y paso 3 (barra media para cada marcador)) derivados de FcR-UDC I-PSC modificada en comparación a PB-NK expandida (barra derecha para cada marcador). Los pasos 2 y 3 se ilustran en la figura 1.

[00022] Las figuras 11A-11B son gráficas de barras que ilustran la expresión de receptores de citocina y quimiocina en células FcR-UDC I-NK (paso 2 (barra izquierda para cada receptor) y paso 3 (barra media para cada receptor)) derivadas de FcR-UDC I-PSC modificada en comparación a PB-NK expandida (barra derecha para cada receptor). Los pasos 2 y 3 se ilustran en la figura 1.

[00023] Las figuras 12A-12C son gráficas de barras que ilustran la expresión de marcadores de adhesión/direccionamiento, coestimuladores, y apoptóticos en células FcR-UDC I-NK (paso 2 (barra izquierda para cada receptor) y paso 3 (barra media para cada receptor)) derivadas de FcR-UDC I-PSC modificadas en comparación a PB-NK expandida (barra derecha para cada receptor). Los pasos 2 y 3 se ilustran en la figura 1.

[00024] La figura 13 es una gráfica lineal que ilustra la citotoxicidad celular natural (NCC) de las células NK derivadas de PSC NIH3 y W1C1, UDC I-PSC (2F7 (NIH) y 1A6

(W1C1)), FcR-UDC I-PSC (3C1), y UDC I/II-PSC (10A7 (NIH) y 2A6 (W1C1)), contra células diana tumorales K562. El porcentaje de lisis específica se proporciona en el eje y, y la relación de células efectoras a diana (E/T) se proporciona en el eje x. Las células UDC-NK divulgadas en la presente mediaron la lisis celular a través de múltiples líneas celulares de PSC y clones editados por genes.

[00025] La figura 15 es una gráfica de líneas que ilustra NCC de células I-NK FcR-UDC en comparación a PB-NK expandida. El porcentaje de lisis específica se proporciona en el eje y, y la relación de células efectoras a diana (E/T) se proporciona en el eje x. La población de células UDC-NK divulgada en la presente mediaba la lisis celular en un grado comparable a PB-NK.

[00026] La figura 16 es una gráfica de líneas que ilustra que FcR-UDC I-NK no exhibe fratricida ni citotoxicidad contra PBMC de donantes, pero exhibe NCC contra células diana tumorales K562.

[00027] La figura 17 es una gráfica de líneas que demuestra la eficacia de células NK modificadas (célula FcR-UDC I-NK) para aniquilar células tumorales K562 adicionadas en serie de una manera dependiente de la dosis.

[00028] Las figuras 18A-18D son gráficas de líneas que ilustran la actividad de citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) de las células FcR-UDC I-NK modificadas

generadas usando los métodos descritos en la presente. El porcentaje de lisis específica se proporciona en el eje y, y la relación de células efectoras a diana (E/T) se proporciona en el eje x. En las figuras 18A-18C, la población de células FcR-UDC I-NK divulgada en la presente demostró actividad de ADCC contra 3 líneas de células tumorales CD20⁺ diferentes: Daudi (figura 18A), Ramos (figura 18B) y Raji (figura 18C) utilizando Rituximab disponible comercialmente que se une a CD20 en comparación a un control de IgG1. En la figura 18D, PB-NK expandida no mostró ninguna diferencia en la actividad de ADCC entre Rituximab y el control de IgG1. Los círculos no representan ningún anticuerpo, los cuadrados representan IgG1 humana, y los triángulos representan Rituximab.

[00029] La figura 19 es una gráfica de barras que ilustra la actividad de NCC y ADCC de células FcR-UDC I-NK en un amplio intervalo de líneas de células de linfoma B.

[00030] La figura 20A son gráficas de barras que identifican las citocinas inducibles después de la estimulación con células tumorales Raji recubiertas con Rituximab (R-mab) en células FcR-UDC I-NK (barra izquierda para cada condición observada) en comparación a PB-NK expandida (barra derecha para cada condición observada). El eje x para cada gráfica indica "sin estimulación", "Raji+hIgG1" y "Raji+R-mab". Se observó una elevación significativa para TNF-alfa, interferón-gamma, GM-CSF, e IP-

10. Se observó una elevación moderada para la granzima-B, MIP-1alfa, MIP-1beta, RANTES, IL-8, IL-10, y MCP-1. Las citocinas no detectadas incluyeron IL-1alfa, IL-1beta, IL-6 e IL-12 como se muestra en las figuras 20B-20E.

5 **[00031]** Las figuras 21A-21D son gráficas de barras que identifican citocinas y/o quimiocinas que no se elevaron después del co-cultivo con PBMC alogénicas versus co-cultivo con Raji más Rituximab en células FcR-UDC I-NK (barra izquierda para cada condición) en comparación a PB-NK expandida (barra derecha para cada condición). El eje x para cada gráfico indica "sin estimulación", "Raji+Rituximab" y "AloPBMC".

10

[00032] Las figuras 22A-22G son gráficas de barras que ilustran la persistencia *in vivo* de células FcR-UDC I-NK en la ausencia de cualquier antígeno en ratones no portadores de tumor. Las células NK (4×10^6) se inyectaron i.v. en los ratones seguido por la administración de IL-2 (30,000 UI, 3x/semana) e IL-15 (100 ng, diariamente durante 7 días). Se midieron el porcentaje y el número absoluto de células FcR-UDC I-NK en la sangre, el bazo y la médula ósea.

15

20

[00033] Las figuras 23A-23E son gráficas de barras que ilustran la distribución de tejido *in vivo* de células FcR-UDC I-NK en ratones no portadores de tumor. Las células NK (5×10^6 , 7.5×10^6 y 10×10^6) se inyectaron i.v. seguido por la administración de IL-2 (30,000 UI, 3x/semana) e IL-15 (100

25

ng, diariamente). El porcentaje de células CD56⁺ humanas (células FcR-UDC I-NK) dentro de CD45 de ratón más humano se midió en el pulmón (figura 23B), hígado (figura 23D), bazo (figura 23E), sangre (figura 23A), y médula ósea (figura 23C).

[00034] La figura 24 es una gráfica de un estudio de eficacia de células FcR-UDC I-NK más Rituximab en un modelo de tumor i.p. Raji. Los ratones NSG se irradiaron y se inyectaron (i.p.) con células tumorales Raji (3×10^5). En el día 4, se administraron células I-NK de FcR-UDC o células PB-NK (cada una 5×10^6) con o sin Rituximab (300 µg). En el día 7, se administró una dosis adicional de Rituximab (300 µg). Las imágenes/monitoreo de los ratones NSG se presentan en los puntos de tiempo indicados hasta el día 120.

[00035] Las figuras 25A-25C ilustran (figura 25A) una curva de supervivencia y (figuras 25B-25C) la carga tumoral después del estudio de eficacia de la figura 24. En la figura 25A, tanto las células FcR-UDC I-NK más Rituximab como PB-NK más Rituximab tuvieron un incremento significativo en la mediana de supervivencia (días) en comparación a las células no tratadas, Rituximab, FcR-UDC I-NK, y PB-NK solo. Rituximab y PB-NK solos incrementaron la mediana de supervivencia (días) en comparación con a los no tratados. En las figuras 25B-25C, las células FcR-UDC I-NK más Rituximab y PB-NK más Rituximab proporcionaron una respuesta duradera en el retardo del

inicio de tumor hasta el día 60 en el 50% de los ratones.

[00036] La figura 26 es una gráfica de un estudio de eficacia de células FcR-UDC I-NK más Rituximab en un modelo de tumor i.p. Raji. Los ratones NSG se irradiaron y se
5 inyectaron (i.p.) con células tumorales Raji (2×10^5). En el día 2, se administraron células FcR-UDC I-NK (10×10^6) con o sin Rituximab (100 µg). En los días 6, 10 y/o 16, se administraron dosis adicionales de células FcR-UDC I-NK o células PB-NK (cada 10×10^6). La imaginería/monitoreo de los
10 ratones NSG se presentan en los puntos de tiempo indicados hasta el día 86.

[00037] Las figuras 27A-27B ilustran (figura 27A) la carga tumoral y (figura 27B) una curva de supervivencia después del estudio de eficacia de la figura 26. En la figura 27A, las
15 células FcR-UDC I-NK más Rituximab (D2, 10 y 16) tuvieron una respuesta duradera más larga para retardar el inicio de tumor en comparación a las células FcR-UDC I-NK más Rituximab (D2, 6 y 10). En la figura 27B, tanto las células FcR-UDC I-NK más Rituximab (independientemente del régimen de dosificación)
20 tuvieron un incremento significativo en la mediana de supervivencia (días) en comparación a las células FcR-UDC I-NK no tratadas, Rituximab, y FcR-UDC I-NK solas.

[00038] Las figuras 28A-28B se refieren a un estudio de eficacia usando ratones NOGf que tienen FcγR de ratón
25 suprimido. La figura 28A es una gráfica del estudio en donde

se administraron Rituximab o células FcR-UDC I-NK más Rituximab en un modelo de tumor Raji. Los ratones NOGf se inyectaron (i.v.) con células tumorales Raji (1×10^5). Rituximab (100 µg, i.p.) se administró en los días 1, 8 y 15
 5 después de la implantación de células tumorales, y FcR-UDC-I-NK (10M) se administró i.v. en los días 1, 4, 8, y 15. La figura 28B ilustra la carga tumoral después del estudio de eficacia de la figura 28A. Las células FcR-UDC I-NK crioconservadas más Rituximab demostraron un mayor grado de
 10 inhibición de crecimiento tumoral en comparación a la administración de Rituximab solo.

[00039] Las figuras 29A-29B se refieren a un estudio de eficacia usando ratones NOGf modificados para expresar interleucina 15 humana (IL-15) y que tienen FcγR de ratón
 15 suprimido. La figura 29A es una gráfica del estudio en donde se administraron Rituximab (50 o 100 µg, i.p.) o células FcR-UDC I-NK (3×10^6 (3M) o 15×10^6 (15M), i.v.) más Rituximab (50 o 100 µg, i.p.) en un modelo de tumor Raji. La figura 29B ilustra la carga tumoral después del estudio de eficacia de
 20 la figura 29A. Las células FcR-UDC I-NK crioconservadas 15M más Rituximab demostraron un gran grado de inhibición de crecimiento tumoral en comparación a Rituximab solo.

[00040] La figura 30 es una gráfica de líneas que ilustra el efecto antitumoral de células FcR-UDC I-NK más anticuerpos
 25 anti-claudina 6 (CLDN6) (mAb ASP1893, un anticuerpo anti-

CLDN6 humanizado y ASP1650, un anticuerpo anti-CLDN6 quimérico humano/de ratón) contra células tumorales positivas para CLDN6 (la línea celular de cáncer de ovario PA-1). La lisis específica (%) se presenta en el eje y y la cantidad de anticuerpo ASP1893 mAb o ASP1650 (ng/mL) se presenta en el eje x. Los anticuerpos anti-CLDN6 mAb ASP1893 y ASP1650 indujeron ADCC comparable con células FcR-UDC I-NK contra células tumorales CLDN6+.

[00041] Las figuras 31A-31M son gráficas de líneas que ilustran el efecto antitumoral de células FcR-UDC I-NK más anticuerpos anti-CLDN6 contra células tumorales que expresan diversos niveles de CLDN6. Los ensayos se realizaron con células FcR-UDC I-NK con anticuerpo ASP1893 mAb con anticuerpo de IgG1 de control, o sin anticuerpo. Las figuras 31A-31D representan ensayos que utilizan células tumorales que expresan altamente CLDN6 (células SKOV3-CLDN6, ES-2-CLDN6, PA-1 y NEC14). Las figuras 31E-31G representan ensayos que utilizan células tumorales que expresan niveles moderados de CLDN6 (células ABC-1, OV90, y OVCAR3). Las figuras 31H-31I representan ensayos que usan células tumorales que expresan bajos niveles de CLDN6 (células COV362 y NEC8-Luc). Las figuras 31J-31M representan ensayos que utilizan células tumorales que no expresan CLDN6 (células COV318, ES-2, SKOV3 y NCI-H1373). La lisis específica (%) se presenta en el eje y y la relación E/T se presenta en el eje x. Las células FcR-

UDC I-NK mediaron ADCC con mAb ASP1893 contra células tumorales de manera dependiente de la expresión de CLDN6.

- [00042]** Las figuras 32A-32B ilustran la secreción de citocinas de células FcR-UDC I-NK. Las figuras son gráficas de barras que correlacionan interferón-gamma (IFN-g; pg/mL) o factor de necrosis tumoral alfa (TNF-a) producido por células FcR-UDC I-NK en presencia de células tumorales (barra izquierda para cada línea celular analizada), células tumorales con IgG1 humana (barra media para cada línea celular analizada) y células tumorales con anticuerpo anti-CLDN6 (mAb ASP1893) (barra derecha para cada línea celular probada). Las células SKOV3-CLDN6, ES-2-CLDN6, PA-1 y NEC14 muestran altos niveles de CLDN6. ABC-1 y OV90, las células muestran niveles moderados de CLDN6. Las células COV362 y NEC8-Luc expresan bajos niveles de CLDN6. Las células COV318, ES-2 y SKOV3 son negativas para CLDN6. Las células FcR-UDC I-NK exhibieron producción de IFN-g y TNF-a después de la estimulación con células tumorales y mAb ASP1893 de una manera dependiente de la expresión de CLDN6.
- [00043]** La figura 33 es un esquema de un ensayo *in vivo* que examina la eficacia antitumoral de las células UDC-NK en conjunto con el anticuerpo anti-CLDN6 en un modelo de ratón de tumor sólido de xenoinjerto PA-1. Los ratones NOGf IL-15 expresaron IL-15 humana y carecían de FcγR de ratón.
- [00044]** Las figuras 34A-34B ilustran el volumen tumoral

(figura 34A) y la curva de supervivencia (figura 34B) después del estudio de eficacia de la figura 33. El tratamiento de combinación de células FcR-UDC-NK y anticuerpo anti-CLDN6 dio por resultado la inhibición del crecimiento tumoral (figura 34A) y prolongó la supervivencia de ratones en el modelo de tumor SC PA-1 (figura 34B).

[00045] Las figuras 35A-35C se relacionan con un estudio que examina la eficacia antitumoral de las células UDC-NK junto con el anticuerpo anti-CLDN6 en un modelo de ratón de tumor sólido de xenoinjerto de PA-1 usando ratones NOGf modificados para expresar la interleucina 15 humana (IL-15) y que tienen FcγR de ratón suprimido. La figura 35A es un esquema del ensayo *in vivo* en el que se administraron células FcR-UDC-NK 7.5M i.v. en los días 16, 20, 23 y 27 y se administró anticuerpo anti-CLDN6 (300 μg, i.p.) en los días 16 y 23. Las figuras 35B-35C ilustran el volumen tumoral (figura 35B) y la curva de supervivencia (figura 35C) después del estudio de eficacia de la figura 35A. El tratamiento de combinación de células FcR-UDC-NK y anticuerpo anti-CLDN6 dio por resultado la inhibición del crecimiento tumoral (figura 35B) y prolongó la supervivencia de ratones en el modelo de tumor SC PA-1 (figura 35C).

[00046] Las figuras 36A-36B ilustran la actividad de ADCC de células FcR-UDC-NK. La figura 36A es una gráfica de líneas que ilustra el efecto antitumoral de células FcR-UDC I-NK más

anticuerpo anti-claudina 18.2 (Zolbetuximab) contra células tumorales BxPC3-CLDN18.2-Luc. La lisis específica (%) se presenta en el eje y y la relación de E:T se presenta en el eje x. La figura 36B es una gráfica lineal que ilustra el efecto antitumoral de células FcR-UDC I/II-NK más anticuerpo anti-claudina 18.2 (zolbetuximab) contra células diana tumorales BxPC3-CLDN18.2-Luciferasa. La intensidad fluorescente de las células diana restantes, normalizada al inicio del experimento, se presenta en el eje y y el tiempo de medición se presenta en el eje x.

[00047] Las figuras 37A-37B son gráficas de barras que ilustran la secreción de interferón-gamma (figura 37A) o factor de necrosis tumoral alfa (figura 37B) por FcR-UDC I-NK en muestras que comprenden células tumorales BxPC3-CLDN18.2-Luc solas, células tumorales BxPC3-CLDN18.2-Luc con IgG humana o células tumorales BxPC3-CLDN18.2-Luc con zolbetuximab.

Descripción Detallada de la Invención

[00048] La presente divulgación proporciona una población de células asesinas naturales (NK) con atributos ventajosos para la terapia de células inmunitarias. Los materiales y métodos descritos en la presente permiten la producción de, por ejemplo, una población sustancialmente homogénea de células NK con aparición reducida de células no deseadas, perfiles de seguridad mejorados, persistencia fuerte *in vivo*,

capacidad potenciada para injertar en un sujeto, y/o capacidad potenciada para reducir la carga tumoral.

[00049] La divulgación proporciona una población de células NK derivadas de células madre pluripotentes, que incluyen
5 células madre embrionarias (ESC) y células madre pluripotentes inducidas (iPSC). La divulgación proporciona además una población de células NK modificadas, en donde las células NK expresan al menos un polipéptido exógeno seleccionado del grupo que consta de antígeno de leucocitos
10 humanos E (HLA-E), antígeno de leucocitos humanos F (HLA-F), y antígeno de leucocitos humanos G (HLA-G). Las células NK se modifican genéticamente para interrumpir una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de la β -2 microglobulina endógena (B2M) de las células y/o una o más copias (por
15 ejemplo, todas las copias) de un gen relacionado con el antígeno leucocitario humano (HLA) de clase II seleccionado del grupo que consta de proteína que contiene anquirina asociada al factor X regulador (RFXANK), factor 5 regulador (RFX5), proteína asociada al factor X regulador (RFXAP) y
20 transactivador de clase II (CIITA). Las interrupciones permiten que las células NK, por ejemplo, reduzcan o evadan la detección inmunitaria, y permiten la producción de una población de células NK que no requiere la coincidencia de HLA para aplicaciones terapéuticas. Opcionalmente, las
25 células NK también expresan un receptor de antígeno quimérico

(CAR) (por ejemplo, un CAR universal), un receptor Fc (FcR o CD16), un receptor NKG2D no natural, u otro tipo de receptor.

[00050] Las células NK son linfocitos citotóxicos del sistema inmunitario innato capaces de la vigilancia
5 inmunitaria. Las células NK son agentes terapéuticos atractivos por su citotoxicidad natural para células extrañas, transformadas o infectadas por virus, su citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos y su perfil de liberación de citocinas que puede amplificar una respuesta
10 inmunitaria. Las células NK se definen habitualmente por la expresión de CD56 o CD16 y la ausencia de CD3. En varios aspectos de la divulgación, las células NK expresan uno o más (por ejemplo, dos o más, tres o más, cuatro o más, etc.) marcadores de superficie celular seleccionados de CD56, CD45,
15 CD25, DNAM-1, NKp30, NKG2D, y/o NKp44. Los métodos para detectar marcadores de superficie celular se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, métodos basados en citometría de flujo.

[00051] Las células NK (o una PSC de la cual se deriva la
20 célula NK o un compuesto intermedio de esta) se modifican genéticamente para interrumpir una o más copias (por ejemplo, todas las copias) del gen B2M endógeno de las células. B2M es un componente crítico del complejo de HLA de clase I (HLA-I). HLA es un complejo de superficie celular que media las
25 interacciones de leucocito-leucocito o las interacciones de

leucocitos con otras células. Las moléculas de HLA-I son complejos de superficie celular que presentan antígenos a las células T citotóxicas CD8+, mediando de esta manera la inmunidad celular. Las moléculas de HLA-I comprenden una
5 cadena pesada de HLA-I y B2M. La interrupción genética de una o más (por ejemplo, todas) las copias del gen B2M reduce o anula la producción de la proteína B2M (SEQ ID NO: 5), reduciendo o anulando de esta manera la presentación de complejos de HLA-I en la célula NK. Una secuencia de ácido
10 nucleico representativa que codifica para B2M se proporciona en SEQ ID NO: 1.

[00052] También se contemplan células NK (o una PSC de la que se deriva la célula NK o un compuesto intermedio de la misma) genéticamente modificadas para interrumpir una o más
15 copias (por ejemplo, todas las copias) de un subconjunto de HLA-I. Seis han identificado seis cadenas alfa de HLA de clase I (α), que incluyen tres clásicas (HLA-A, HLA-B, y HLA-C) y tres no clásicas (HLA-E, HLA-F, y HLA-G), que son responsables de la especificidad de la unión de péptidos en
20 la hendidura de unión de HLA-I. Con respecto a esto, la divulgación contempla células NK modificadas genéticamente para interrumpir una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de un gen de HLA-I seleccionado de HLA-A, HLA-B, HLA-C, HLA-E, HLA-F, y HLA-G, así como combinaciones de los
25 mismos. Por ejemplo, las células NK (o una PSC de la que se

deriva la célula NK o un compuesto intermedio de la misma) se pueden modificar genéticamente para interrumpir una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de HLA-A, HLA-B, y/o HLA-C. Las moléculas de HLA se describen adicionalmente en,
 5 por ejemplo, Choo, Yonsei Med J., 48(1): 11-23 (2007); www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/; y Números de Acceso de GenBank NG_029217 (HLA-A), XP_041536701 (HLA-A), NG_023187 (HLA-B), NP_005505 (HLA-B), NG_029422 (HLA-C), NP_001229971 (HLA-C), NM_005516 (HLA-E), NP_005507 (HLA-E), NG_012009 (HLA-F),
 10 NP_001091949 (HLA-F), NG_029039 (HLA-G), y NP_001371219 (HLA-G).

[00053] Las células NK de la divulgación (o una PSC de la cual se deriva la célula NK o un compuesto intermedio de la misma) se modifican genéticamente para interrumpir una o más
 15 (por ejemplo, todas) las copias de un gen relacionado con HLA de clase II (HLA-II) seleccionado de RFXANK, RFX5, RFXAP, y CIITA. Las moléculas de HLA-II son proteínas transmembrana que se encuentran en células presentadoras de antígeno (APC) y, a veces, en órganos sólidos. Las moléculas de HLA-II
 20 comprenden dos subunidades homólogas, la subunidad alfa (α) y la subunidad beta (β). Los genes relacionados con HLA-II codifican para proteínas reguladoras de HLA-II que regulan la expresión de moléculas de HLA de clase II. La alteración genética de una o más copias (por ejemplo, todas las copias)
 25 de uno o más de los genes relacionados con HLA-II RFXANK,

RFX5, RFXAP, y/o CIITA reduce o anula la producción de las proteínas codificadas, reduciendo o anulando de esta manera la presentación de complejos de HLA-II en la célula NK. La célula NK (o un PSC del cual se deriva la célula NK o un compuesto intermedio de la misma) puede comprender interrupciones de una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de los genes que codifican para uno de RFXANK, RFX5, RFXAP, y/o CIITA (por ejemplo, la célula se modifica para interrumpir una o más copias (por ejemplo, todas las copias) del gen RFXANK); una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de los genes que codifican para cualquier combinación de dos de RFXANK, RFX5, RFXAP, y/o CIITA; una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de los genes que codifican para cualquier combinación de tres de RFXANK, RFX5, RFXAP, y/o CIITA; o una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de los genes que codifican para todos de RFXANK, RFX5, RFXAP, y CIITA. RFXANK se codifica por, por ejemplo, la secuencia de SEQ ID NO: 3 y 5; RFX5 se codifica por, por ejemplo, la secuencia de SEQ ID NO: 7 y 9; RFXAP se codifica por, por ejemplo, SEQ ID NO: 11; y CIITA se codifica por, por ejemplo, SEQ ID NO: 13. En diversos aspectos de la divulgación, las células NK se modifican para interrumpir todas las copias de B2M y RFXANK.

[00054] Se puede utilizar cualquier técnica adecuada para introducir una alteración en un gen diana (por ejemplo, un

gen relacionado con HLA-II, un gen de B2M, o cualquier otro gen de interés). Muchas técnicas para interrumpir secuencias de codificación endógenas se conocen en la técnica, incluyendo el uso de sistemas de edición génica tal como

5 sistemas CRISPR/Cas (repeticiones palindrómicas cortas agrupadas regularmente intercaladas y proteína asociada a CRISPR), nucleasas efectoras tipo activador de transcripción (TALEN), y nucleasas con dedos de zinc, así como vectores de direccionamiento que escinden e/o insertan secuencias de

10 ácido nucleico en un sitio diana en el genoma celular. Una técnica de ejemplo emplea la edición basada en vectores de virus adenoasociado (AAV), que opcionalmente implica la inserción dirigida de una secuencia editada (potencialmente un transgén) en el genoma celular para interrumpir una

15 secuencia de codificación endógena, lo que da por resultado la reducción o evitación de la producción de la proteína endógena. En diversos aspectos, se emplean vectores de AAV de serotipo 3B. El uso de vectores de AAV para modificar genéticamente células madre se describe adicionalmente en,

20 por ejemplo, Riolo et al., *Molecular Therapy*, 21(6), 1232-1241 (2013), incorporada por la presente como referencia en su totalidad y particularmente con respecto a la divulgación del uso de vectores de AAV y la interrupción de la producción de complejo de HLA. Los métodos para confirmar la

25 interrupción de un gen diana se conocen en la técnica e

incluyen, pero no se limitan a, métodos de detección de PCR (por ejemplo, reacción en cadena de polimerasa en tiempo real cuantitativa (qRT-PCR)), secuenciación de ARN, métodos de secuenciación de próxima generación, citometría de flujo, e
5 inmunotinción.

[00055] En diversos aspectos, las células NK modificadas expresan al menos un polipéptido seleccionado del grupo que consta de HLA-E, HLA-F, y HLA-G. En el contexto de la divulgación, la célula NK se modifica para expresar HLA-E,
10 HLA-F, y/o HLA-G, es decir, un ácido nucleico que codifica para HLA-E, HLA-F, y/o HLA-G se introduce en la célula NK (o una PSC de la que se deriva la célula NK o un compuesto intermedio de la misma) y la proteína codificada se produce y se presenta en la superficie celular. Opcionalmente, las
15 células NK modificadas expresan HLA-E. Opcionalmente, la célula NK modificada expresa un HLA-E de fusión de cadena individual que comprende al menos una porción de B2M unida, ya sea directamente o mediante una secuencia de enlazador, a al menos una porción de la cadena α de HLA-I, por ejemplo,
20 HLA-E. Opcionalmente, la célula NK modificada expresa un HLA-F o HLA-G de fusión de cadena individual que comprende al menos una porción de B2M enlazada, ya sea directamente o mediante una secuencia de enlazador, a al menos una porción de la cadena alfa de HLA-I, por ejemplo, HLA-F o HLA-G. La
25 célula NK modificada puede sobreexpresar una proteína que se

produce naturalmente por la célula, puede expresar una proteína codificada por un ácido nucleico exógeno después de la supresión o interrupción de la secuencia de codificación endógena correspondiente para la proteína, o puede expresar

5 una proteína que no se codifica naturalmente por el genoma de célula NK tipo silvestre. Las secuencias de ADN y proteína representativas para HLA-E se proporcionan en SEQ ID NO: 15 y 16. Las secuencias de ADN y proteína representativas para HLA-F se proporcionan en SEQ ID NO: 17 y 18. Las secuencias

10 de ADN y proteína representativas para HLA-G se proporcionan en SEQ ID NO: 19 y 20. Se apreciará que se pueden utilizar variantes de las secuencias proporcionadas en la presente y, como tal, la divulgación contempla el uso de un ácido nucleico que comprende al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

15 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad a las secuencias de ácido nucleico divulgadas en la presente. La divulgación contempla además el uso de un ácido nucleico que codifica para un péptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%,

20 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, o 99% de identidad a cualquiera de las secuencias de aminoácidos descritas en la presente. Preferentemente, una variante retiene funciones de HLA-I tal como, por ejemplo, formar una hendidura de unión a péptido funcional para mostrar péptidos y/o acoplar receptores

25 inhibidores en células NK. Las células que expresan HLA-E,

HLA-F, y/o HLA-G minimizan el riesgo de rechazo cuando se utilizan como una terapia celular adoptiva. En diversos aspectos de la divulgación, las células NK se modifican para interrumpir todas las copias de B2M y RFXANK y se modifican
5 para expresar HLA-E, por ejemplo, HLA-E de fusión de cadena individual.

[00056] Las células NK de la población también pueden expresar un receptor exógeno (es decir, un receptor codificado por un ácido nucleico exógeno introducido en las
10 células NK o una PSC de la que se deriva la célula NK o un compuesto intermedio de la misma). En diversos aspectos, las células NK de la población expresan un receptor de antígeno quimérico. "Receptor de antígeno quimérico" o "CAR" se refiere a un receptor de célula inmunitaria artificial que se
15 modifica para reconocer y unirse a un antígeno expresado por una célula diana, tal como una célula tumoral. En general, un CAR es una quimera de un dominio de señalización del complejo de receptor de células T (TCR) y un dominio de reconocimiento de antígeno (por ejemplo, un fragmento de cadena individual
20 (scFv) de un anticuerpo u otro fragmento de anticuerpo). Ver, por ejemplo, Enblad et al., Human Gene Therapy. 2015; 26(8):498-505. Hay varios formatos de CAR, cada uno de los cuales contiene diferentes componentes. Los CAR de "primera generación" unen un dominio de unión a antígeno al dominio de
25 señalización intracelular de CD3zeta del receptor de células

T a través de dominios bisagra y transmembrana. Un dominio de señalización citoplasmática o intracelular produce señales estimuladoras para la proliferación y la función efectora cuando el CAR se acopla con un antígeno diana. Muchos

5 dominios de señalización intracelular contienen motivos de señalización que se conocen como motivos de activación basada en tirosina de inmunoreceptor (ITAM). Los ejemplos de ITAM que contiene secuencias de señalización citoplasmática incluyen aquellas derivadas de CD8, CD3zeta, CD3gamma,

10 CD3epsilon, CD32 (Fc gamma RIIa), DAP10, DAP12, CD79a, CD79b, FcRI, FcRIII, FcRI (FCERIB), y FcRI (FCERIG). Los dominios de señalización intracelular, que incluyen los derivados de CD3 zeta (CD3), se conocen en la técnica (TCR zeta, por ejemplo, núm. de acceso de GenBank

15 BAG36664.1). Los dominios bisagra de ejemplo incluyen, pero no se limitan a, una bisagra de CD28, una bisagra de CD8 alfa, un dominio bisagra de IgG4 humana, y un dominio bisagra de IgG4 humana combinado con un dominio de IgG4 humana de CH3. Los dominios bisagra se describen adicionalmente en, por

20 ejemplo, Hudecek et al. (2013) Clin. Cancer Res., 19:3153, Publicación de Patente Internacional núm. WO 2014031687, y Patente de Estados Unidos de América núm. 8,822,647. Los CAR de "segunda generación" incorporan un dominio adicional, por ejemplo, CD28, 4-1BB (41BB), o ICOS, para suministrar una

25 señal coestimuladora. Los dominios coestimuladores

adicionales incluyen, pero no se limitan a, CD27, CD134, OX40, CD149, DAP10, CD30, IL2-R, IL7r6, IL21-R, NKp30, NKp44, CD40, CD137, PD-1, ICOS, antígeno-1 asociado con la función de linfocitos (LFA-1), CD2, CD7, LIGHT, NKG2C, B7-H3, o

5 dominios coestimuladores de DNAM-1 (o cualquier combinación de los mismos). Los CAR de "tercera generación" contienen dos dominios coestimuladores fusionados con la cadena de CD3zeta de TCR. Los dominios coestimuladores de tercera generación pueden incluir, por ejemplo, una combinación de CD3zeta,

10 CD27, CD28, 4-1BB, ICOS, u OX40. Los CAR contruidos de esta manera pueden activar, por ejemplo, la activación celular después de la unión al antígeno tomado como diana de una manera similar a un receptor de células T endógenas, pero independiente del complejo mayor de histocompatibilidad

15 (MHC).

[00057] Opcionalmente, las células NK pueden expresar un receptor de región (FcR) de fragmento cristalizabale (Fc), por ejemplo, CD16 (FcγRIII). En este sentido, la célula NK se puede modificar para expresar un FcR, es decir, un ácido

20 nucleico que codifica para un FcR se introduce en la célula NK (o una PSC de la que se deriva la célula NK o un compuesto intermedio de la misma) y la proteína codificada se produce y se presenta en la superficie celular. En general, un FcR comprende un dominio extracelular, un dominio transmembrana,

25 y un dominio intracelular. El dominio extracelular

generalmente incluye un dominio que se une a una región Fc de inmunoglobulina (Ig). El dominio intracelular comprende una porción suficiente de un receptor Fc para permitir que el ITAM inicie la señalización celular cuando una región Fc de Ig se une al dominio extracelular. Las células que expresan FcR median la eficacia de ambos agentes terapéuticos basados en anticuerpos y, en menor medida, respuestas inmunitarias adaptativas mediadas por células B. Las células NK son mediadores de la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) impulsada por la unión de Fc a FcR. En ADCC, un FcR de células NK se une a un anticuerpo y forma una sinapsis lítica en la interfaz con la célula diana, activando la liberación de citocinas y gránulos líticos. Estos gránulos contienen enzimas como perforina y granzima B, que inducen la destrucción de la célula diana recubierta con anticuerpo. Las células NK modificadas que expresan un receptor de región Fc se mencionan en la presente como "células FcR-UDC-NK" o "células FcR-NK".

[00058] La célula NK puede expresar un Fc-gamma (receptor $\gamma\gamma$, un Fc-alfa (receptor $\alpha\alpha\alpha$, o un Fc-epsilón (receptor $\epsilon\epsilon\epsilon$). La familia de receptores Fc γ se une a IgG e incluye Fc γ RI (CD64), Fc γ RII (CD32, incluyendo CD32a, CD32b, y CD32c), y Fc γ RIII (CD16, incluyendo CD16a y CD16b). CD16a tiene dos variantes alélicas, 158V y 158F, que poseen diferentes afinidades por IgG; la célula NK de la divulgación puede

expresar CD16a, CD16b, o ambas. Según se informa, los pacientes con cáncer que son homocigotos para el alelo de mayor afinidad de 158V de CD16a responden mejor a los agentes terapéuticos de anticuerpos monoclonales (mAb) (ver, por ejemplo, Cartron et al. Blood. 99, 754-58 (2002)). FcRn también se une a IgG. La familia de receptores Fc γ se une a IgE e incluye Fc γ RI y Fc γ RII (CD23). La familia de receptores Fc α se une a IgA e incluye Fc α RI (CD89) y Fc α RII. Las células NK pueden expresar cualquiera de uno o más de estos FcR. Además, el FcR puede ser un FcR quimérico, en donde parte de la estructura de FcR se deriva de un tipo de FcR y otra parte se deriva de un FcR diferente (o es sintético por lo que funciona de manera similar a una subunidad de FcR).

[00059] La célula NK puede expresar un receptor de NKG2D no natural, tal como un receptor que comprende ectodominio de receptor de NKG2D no natural que se une a dominios α 1- α 2 de ligando de NKG2D modificado con mayor afinidad que a dominios α 1- α 2 naturales. Los receptores de NKG2D no naturales se describen adicionalmente, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos de América núm. 10,259,858, y la Publicación de Patente de Estados Unidos de América núm. 2020/0138866, cada una de las cuales se incorpora como referencia en su totalidad y particularmente con respecto a su divulgación de ectodominios de NKG2D modificados.

[00060] Las células NK de la población también pueden

expresar un polipéptido exógeno (es decir, un polipéptido codificado por un ácido nucleico exógeno introducido en las células NK o una PSC de la que se deriva la célula NK o un compuesto intermedio de la misma). En diversos aspectos, las
5 células NK de la población expresan una citocina, quimiocina, o similares, incluyendo, pero no limitado a, IL-15 o IL-2

[00061] Opcionalmente, las células NK comprenden además una molécula de ácido nucleico que codifica para un producto génico suicida. También se contemplan combinaciones de
10 moléculas de ácido nucleico que codifican para diferentes productos de genes suicidas. Los genes suicidas son útiles para aniquilar selectivamente células al inducir apoptosis o convertir un compuesto no tóxico en un compuesto tóxico, dando por resultado la muerte de células no deseadas. Los
15 ejemplos de productos génicos suicidas incluyen, pero no se limitan a, caspasas (por ejemplo, caspasa 9), timidina cinasas, citosina deaminasas, citocromo P450, y DNasas. Ver, por ejemplo, Publicación de Patente de Estados Unidos de América núm. 2022/0025001, incorporada por la presente como
20 referencia. Opcionalmente, el ácido nucleico que codifica para el producto génico suicida se enlaza operativamente a un promotor inducible. Ver, por ejemplo, Straathof et al. Blood, 105(11), 4247-4254 (2005), incorporada por la presente como referencia. Opcionalmente, las células NK modificadas
25 comprenden un gen suicida de timidina cinasa (TK) de virus de

herpes simple. Ver, por ejemplo, Bonini, et al., Science, 276, 1719-1724 (1997), incorporada por la presente como referencia. Opcionalmente, las células NK modificadas comprenden una o más copias del gen suicida de TK. En

5 diversos aspectos, la célula NK comprende un ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión de higromicina-timidina cinasa. Por ejemplo, las células NK pueden comprender un ácido nucleico que codifica para TK de HSV y un ácido nucleico que codifica para una proteína de fusión de

10 higromicina-timidina cinasa. En otra modalidad, las células NK se pueden eliminar por agotamiento mediado por anticuerpos dirigidos usando cualquier cantidad de dianas específicas de células NK, incluyendo, pero no limitado a, CD56, CD45, CD25, DNAM-1, NKp30, NKG2D, y/o NKp44.

15 **[00062]** Los métodos para modificar genéticamente una célula hospedadora para producir de manera estable uno o más productos génicos de interés se conocen en la técnica. Los métodos de ejemplo implican el uso de vectores virales. Los vectores virales pueden incluir cualquier vector viral

20 adecuado que incluye, por ejemplo, retrovirus, adenovirus, parvovirus (por ejemplo, virus adenoasociados), coronavirus, ortomixovirus (por ejemplo, virus de influenza), rabdovirus (por ejemplo, virus de la rabia y estomatitis vesicular), paramixovirus (por ejemplo, sarampión y Sendai),

25 picornavirus, alfavirus, herpesvirus (por ejemplo, virus del

herpes simple tipo 1 y 2, virus de Epstein-Barr, citomegalovirus), y virus de viruela (por ejemplo, variolovacuna, viruela aviar, y viruela de canario). Los ácidos nucleicos exógenos también se pueden introducir en una
5 célula hospedadora mediante técnicas de edición génica usando, por ejemplo, los sistemas descritos en la presente. Preferentemente, el ácido nucleico que codifica para el CAR o FcR y el ácido nucleico que codifica para HLA-E, HLA-F, o HLA-G se integran en el genoma celular, tal como en los locus
10 B2M o HLA-II. Por lo tanto, en diversos aspectos, los locus de B2M se alteran al insertar en los locus de B2M un ácido nucleico que codifica para un producto génico diferente para reemplazar la expresión de la proteína de B2M tipo silvestre endógena. De manera alternativa o además, ciertos locus de
15 HLA-II se alteran opcionalmente al insertar en los locus de HLA-II un ácido nucleico que codifica para un producto génico diferente para reemplazar la expresión de la proteína HLA-II tipo silvestre endógena.

[00063] En diversos aspectos de la divulgación, las células
20 NK se derivan de células madre pluripotentes. El término "células madre pluripotentes" incluye células madre embrionarias, células madre derivadas de embriones, y células madre pluripotentes inducidas, independientemente del método por el cual se derivan las células madre pluripotentes. Las
25 células madre pluripotentes se definen habitualmente de

manera funcional como células madre que son: (a) capaz de inducir teratomas cuando se trasplanta en ratones inmunodeficientes (SCID); (b) capaz de diferenciarse en tipos de células de las tres capas germinales (por ejemplo, se puede diferenciar en tipos de células ectodérmicas, mesodérmicas, y endodérmicas); y (c) expresar uno o más marcadores de células madre embrionarias (por ejemplo, expresar Oct 4, fosfatasa alcalina, antígeno de superficie SSEA-3, antígeno de superficie de SSEA-4, Nanog, TRA-1-60, TRA-1-81, SOX2, REX1, etc.). Las células madre pluripotentes se pueden generar utilizando, por ejemplo, métodos conocidos en la técnica. Los ejemplos de células madre pluripotentes incluyen células madre embrionarias. "Células madre embrionarias" (ESC) incluyen, por ejemplo, células derivadas de la masa celular interna de blastocistos humanos o mórulas, incluyendo aquellas que se han pasado en serie como líneas celulares. Las células madre embrionarias, independientemente de su fuente o del método particular utilizado para producirlas, se pueden identificar con base en, por ejemplo, (i) la capacidad de diferenciarse en células de las tres capas germinales, (ii) la expresión de al menos Oct-4 y fosfatasa alcalina, y (iii) la capacidad de producir teratomas cuando se trasplantan en animales inmunodeficientes.

[00064] Otra célula madre pluripotente de ejemplo es una

célula madre pluripotente inducida (iPSC). Las iPSC se generan, por ejemplo, al reprogramar una célula somática al expresar una combinación de factores ("factores de reprogramación") tal como, pero no limitado a, Oct4, Sox2, c-Myb, Nanog, Lin28, y/o Klf4. Las células madre pluripotentes inducidas se pueden generar utilizando, como un punto de partida, prácticamente cualquier célula somática de cualquier etapa de desarrollo. Por ejemplo, la célula puede ser de un embrión, feto, neonato, joven, o donador adulto. Las células somáticas de ejemplo que se pueden utilizar incluyen células de sangre de cordón CD34+, fibroblastos, tal como fibroblastos dérmicos obtenidos por una muestra de piel o biopsia, sinoviocitos de tejido sinovial, células de prepucio, células de mejilla, o fibroblastos de pulmón. En ciertas modalidades, la célula somática no es un fibroblasto.

[00065] Las células madre pluripotentes pueden ser de cualquier especie. Las células madre embrionarias se han derivado exitosamente, por ejemplo, ratones, múltiples especies de primates no humanos, y seres humanos. Por lo tanto, un experto en la técnica puede generar células madre embrionarias de cualquier especie, incluyendo pero no limitado a, primates humanos, no humanos, roedores (ratones y ratas), ungulados (vacas, ovejas, etc.), perros (perros domésticos y silvestre), gatos (gatos domésticos y silvestre tal como leones, tigres, y guepardos), conejos, hámsteres,

jerbos, ardilla, cobaya, cabras, elefantes, panda (incluyendo panda gigante), cerdos, mapache, caballo, cebra, mamíferos marinos (delfín, ballenas, etc.) y similares. De manera similar, las iPSC pueden ser de cualquier especie. Las iPSC se han generado exitosamente utilizando, por ejemplo, células de ratón y humanas. Por consiguiente, se puede generar fácilmente una iPSC usando una célula de donador de cualquier especie, tal como cualquier especie descrita en la presente.

[00066] La población de células NK de la divulgación tiene una variedad de atributos que hacen que la población sea ventajosa para aplicaciones terapéuticas, por ejemplo, injerto superior, direccionamiento, viabilidad, persistencia, evitación inmunitaria, y/o citotoxicidad. Por ejemplo, en varios aspectos, la población de células NK modificadas es capaz de injertarse en un sujeto después de la administración, utilizando, por ejemplo, protocolos conocidos por un experto en la técnica. Dicho de otra manera, la población de células NK es capaz de dirigirse a un tejido diana (por ejemplo, médula ósea) y/o persistir en un sujeto durante un período después de la administración (por ejemplo, de 24 horas a unos pocos días o semanas o meses). En varios aspectos, al menos una porción de la población de células NK modificadas (por ejemplo, al menos 1%, al menos 2%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40% o la población) es capaz de injertarse en un tejido diana. Por

ejemplo, en varios aspectos, al menos 50% (por ejemplo, al menos 55%, al menos 60%, al menos 65%, al menos 70%, al menos 75%, al menos 80%, al menos 85%, al menos 90%, al menos 95%, o 100%) de la población de células NK modificadas es capaz de

5 injertarse en un tejido diana (por ejemplo, sangre o médula ósea) del sujeto. Opcionalmente, la población de células NK modificadas, una vez administrada a un sujeto, es capaz de permanecer injertada en el tejido diana durante al menos 1 día (por ejemplo, al menos 2 días, al menos 5 días, al menos

10 10 días). Con respecto a esto, al menos una porción de la población de células NK es capaz de permanecer injertada en el tejido diana durante al menos 20 días (por ejemplo, al menos 50 días, al menos 100 días, al menos 200 días, al menos 500 días, o al menos 1000 días) después de la administración.

15 **[00067]** De manera alternativa o además, las células NK de la población son opcionalmente capaces de inducir citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC) y/o citotoxicidad celular natural (NCC) de una célula de cáncer. Las células NK median la NCC mediante la adhesión

20 y conjugación a células diana y la liberación de perforina y granzimas, que inducen la apoptosis en la célula diana. La ADCC es un mecanismo por el cual las células inmunitarias que portan el receptor Fc aniquilan las células recubiertas con anticuerpo después de la unión del receptor Fc a la porción

25 Fc del anticuerpo. Las células NK median la ADCC a través de,

por ejemplo, CD16, cuyo acoplamiento da por resultado la liberación de gránulos citolíticos y mediadores inflamatorios. Los métodos para caracterizar la actividad de ADCC y la actividad de NCC se conocen en la técnica y se describen en la presente y, por ejemplo, en la Publicación de Patente de Estados Unidos núm. 2020/0131475 (que describe un ensayo que implica el uso de células Raji (derivadas de linfoma de Burkett) preincubadas con anticuerpo anti-CD20 como dianas para ensayos de ADCC (Tsirigotis et al., J de Steroid Biochem y Mol Bio 108: 267-271 (2008)); Publicación de Patente de Estados Unidos núm. 2022/0040230; y Bhatnagar et al., Eur. J. Immunol., 44(11): 3368 (2014). En varios aspectos, la administración de la población de células NK a un sujeto que padece de cáncer disminuye la carga o carga tumoral en el sujeto por al menos 1%, al menos 2%, al menos 5%, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90%, o 100%. La carga tumoral se puede caracterizar usando cualquier método adecuado que incluye, pero no se limita a, rayos X, tomografía computarizada (CT), imagenología por resonancia magnética (IRM), tomografía por emisión de positrones (PET), ultrasonido, endoscopia y laparoscopia, niveles de marcadores tumorales, citología, histología, muestreo por biopsia, y/o conteo de células diana en circulación.

[00068] Opcionalmente, al menos una porción de las células NK en la población (por ejemplo, al menos 10%, al menos 20%, al menos 30%, al menos 40%, al menos 50%, al menos 60%, al menos 70%, al menos 80%, al menos 90% o 100%) son más grandes en volumen en comparación a las células NK de sangre periférica. Los métodos para determinar el volumen celular se conocen en la técnica, como se ilustra en Model, Cytometry, 93(3): 281 (2018), incorporada como referencia en su totalidad y particularmente con respecto a las descripciones de los métodos de medición del volumen celular. En diversos aspectos de la divulgación, las células NK de la población tienen al menos aproximadamente un incremento de 5% en el volumen celular en comparación a las células NK de sangre periférica. Por ejemplo, las células NK de la población tienen al menos aproximadamente un incremento de 10% o al menos aproximadamente un incremento de 15% en el volumen celular (por ejemplo, aproximadamente 5% a aproximadamente 20%, aproximadamente 7% a aproximadamente 18%, aproximadamente 10% a aproximadamente 15%, aproximadamente 10% a aproximadamente 20%, o aproximadamente 15% a aproximadamente 20% de aumento) en comparación a las células NK de sangre periférica.

[00069] La divulgación también proporciona un kit que comprende uno o más recipientes que comprenden la población de células NK descrita en la presente. El kit puede

comprender además instrucciones e información escrita sobre las indicaciones y el uso de las células NK. También se contemplan recipientes sellados estériles, por ejemplo, frascos, botella, recipiente, y/o envases que comprenden la población de células NK, opcionalmente con instrucciones para uso adecuadas. En un aspecto adicional, la divulgación proporciona un artículo de fabricación, o forma de dosis unitaria, que comprende: (a) la población de células NK descrita en la presente; (b) un recipiente que contiene esta población; y (c) un marca fijada a este recipiente, o un prospecto de envase en este recipiente que se refiere al uso de estas células NK en el tratamiento de una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer).

[00070] También se proporcionan en la presente composiciones farmacéuticas que comprenden la población de células NK y un portador, excipiente, o diluyente farmacéuticamente aceptable. En aspectos de ejemplo, la composición es una composición estéril. La composición farmacéutica de acuerdo con la divulgación se puede formular para administración mediante cualquier ruta de administración. "Ruta de administración" puede referirse a cualquier ruta de administración conocida en la técnica, incluyendo pero no limitado a aerosol, nasal, oral, transmucosal, transdérmica, o parenteral. "Parenteral" se refiere a una ruta de administración que en general se asocia

con la inyección, que incluye intraorbital, infusión, intraarterial, intracapsular, intracardiaca, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intrapulmonar, intraespinal, intraesternal, intratecal, intrauterina, intravenosa, subaracnoidea, subcapsular, subcutánea, intratumoral, transmucosa, o transtraqueal. La composición puede estar en la forma de una solución o suspensión para infusión o para inyección. Cada componente del portador es "farmacéuticamente aceptable" debido a que debe ser compatible con los otros ingredientes de la formulación y seguro para usarse *in vivo*.

[00071] La divulgación proporciona además un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto en necesidad de esto, el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la población de células NK modificadas o la composición farmacéutica que comprende la población de células NK modificadas, tratando de esta manera la enfermedad o trastorno en el sujeto. De manera similar, la divulgación proporciona el uso de la población de células NK modificadas en el tratamiento de una enfermedad o trastorno, así como el uso de la población de células NK en la preparación de un medicamento para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto en necesidad del mismo.

[00072] En varios aspectos, la enfermedad o trastorno es cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, cáncer de próstata, cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer

de pulmón de células no pequeñas), cáncer de colon, cáncer de endometrio, carcinoma de tejido blando, cáncer de recto, cáncer de vejiga urinaria, melanoma, cáncer de riñón, cáncer renal (por ejemplo, carcinoma de células renales), cáncer de

5 cavidad oral, cáncer de faringe, cáncer pancreático, cáncer uterino, cáncer de tiroides, cáncer de paratiroides, cáncer de piel, cáncer de cabeza y cuello (por ejemplo, carcinoma de células escamosas de cabeza y cuello (HNSCC), cáncer cervical, cáncer de cerebro (por ejemplo, glioblastoma),

10 cáncer de hígado (por ejemplo, carcinoma hepatocelular), cáncer de hueso (por ejemplo, osteosarcoma), o cáncer de ovario. Se contemplan en particular los cánceres hematopoyéticos. Los ejemplos de cánceres también incluyen, pero no se limitan a, leucemias y linfomas, tal como leucemia

15 mieloide aguda, leucemia de células pilosas, leucemia linfocítica crónica, y linfoma no de Hodgkin (por ejemplo, linfoma difuso de células B grandes, linfoma de Burkitt, linfoma de células del manto, y linfoma folicular). Otros cánceres incluyen, pero no se limitan a, rabdomiosarcoma

20 alveolar, cáncer de mama, cáncer del ano, canal anal, o anorrecto, cáncer del ojo, cáncer del conducto biliar intrahepático, cáncer de las articulaciones, cáncer de la nariz, cavidad nasal, u oído medio, cáncer de esófago, cáncer gastrointestinal, linfoma de Hodgkin, mesotelioma maligno,

25 mieloma múltiple, cáncer rectal, cáncer renal (por ejemplo,

carcinoma de células renales (RCC)), cáncer de intestino delgado, cáncer de tejido blando, cáncer de estómago, cáncer testicular, y cáncer de uréter.

[00073] En varios aspectos, la enfermedad o trastorno es una enfermedad o trastorno autoinmunitario. La autoinmunidad es una respuesta inmunitaria a los autoantígenos, lo que da por resultado que el cuerpo ataque a las células y tejidos normales. Hay más de 80 tipos de enfermedades autoinmunitarias. La respuesta del cuerpo a las condiciones autoinmunitarias imita la respuesta contra la infección, lo que implica la activación de las células inmunitarias, la inflamación, y el daño de tejido. En varios aspectos, la condición autoinmunitaria es una de más de 80 enfermedades o síndromes marcados por la pérdida de tolerancia de células B y la producción de autoanticuerpos. En varios aspectos, la afección autoinmunitaria es enfermedad de injerto contra hospedador (GvHD), lupus eritematoso sistémico (SLE), esclerosis múltiple, síndrome de Sjogren, esclerosis sistémica/esclerodermia, esclerosis cutánea, colitis ulcerosa, enfermedad inflamatoria intestinal, pénfigo bulloso, diabetes dependiente de insulina, mellitus o diabetes tipo 1, enfermedad de Crohn, artritis psoriásica o artritis reumatoide.

[00074] El método puede comprender administrar la población de células NK antes de, simultáneamente con, o después de,

una terapia diferente, tal como quimioterapia, resección quirúrgica de un tumor, inmunoterapia (tal como terapia de citocinas o administración de una construcción de anticuerpo), o terapia de radiación. Por ejemplo, la

5 divulgación contempla un método en donde la población de células NK modificadas descritas en la presente se administra a un sujeto en necesidad de esto como parte de un régimen de tratamiento que también comprende la administración de una o más citocinas al sujeto. En algunos aspectos, la citocina es

10 una interleucina (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-19, IL-20. IL-21, IL-22, IL-23, IL-24, IL-25, IL-26, IL-27, IL-28, IL-29, IL-30, IL-31, IL-32, o IL-33). Por ejemplo, en varios aspectos del método,

15 el método comprende además administrar IL-15 y/o IL-2 al sujeto.

[00075] En varios aspectos, el método puede comprender administrar la población de células NK modificadas descritas en la presente (tal como FcR-UDC I-NK (por ejemplo, células

20 diferenciadas que tienen una interrupción en el gen B2M que da por resultado la anulación de la proteína HLA de clase I y que expresan un HLA-E de fusión de cadena individual exógena así como CD16) o FcR-UDC I/II-NK (por ejemplo, FcR-UDC I-NK modificadas adicionalmente con una mutación de supresión de

25 un gen relacionado con HLA de clase II, tal como RFXANK, que

da por resultado la interrupción de la proteína HLA de clase II)) como parte de un régimen de tratamiento que también comprende la administración de uno o más constructos de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpos) al sujeto. La

5 divulgación contempla además un régimen de tratamiento en donde se administra un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno o un producto de proteína tipo anticuerpo (es decir, una proteína con base en características estructurales de anticuerpo que permiten la unión a antígeno) a un sujeto.

10 "Constructo de anticuerpo" se refiere a anticuerpos, fragmentos de unión a antígeno de anticuerpos, o productos de proteína tipo anticuerpo. "Anticuerpo" se refiere en general a una inmunoglobulina intacta. La divulgación en la presente que hace referencia a anticuerpos también se aplica a

15 fragmentos de anticuerpo y productos de proteína tipo anticuerpo. Los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno adecuados incluyen, por ejemplo, un F(ab)2 o un fragmento Fab. Los productos de proteína tipo anticuerpo incluyen, pero no se limitan a, Fv de cadena individual (scFv), diacuerpos,

20 constructos de nanocuerpos, miméticos de anticuerpo, y similares. En diversos aspectos, el método comprende administrar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo o producto de proteína tipo anticuerpo intacto que comprende una región de Fc. En varios aspectos, el anticuerpo,

25 fragmento de anticuerpo, o producto de proteína tipo

anticuerpo se une a un antígeno de superficie celular (por ejemplo, un antígeno tumoral), tal como, pero no limitado a, 5T4, AS, ADRB3, AKAP-4, ALC, Receptor de andrógenos, AOC3, APP, Axin1, AXL, B7H3, B7-H4, BCL2, BCMA, bcr-abl, BORIS, 5 BST2, C242, C4.4a, CA125, CA6, CA9, CAIX, CCL11, CCR5, CD123, CD133, CD138, CD142, CD15, CD15-3, CD171, CD179a, CD18, CD19, CD19-9, CD2, CD20, CD22, CD23, CD24, CD25, CD27L, CD28, CD3, CD30, CD31, CD300LF, CD33, CD352, CD37, CD38, CD4, CD40, CD41, CD44, CD44v6, CD5, CD51, CD52, CD54, CD56, CD62E, 10 CD62P, CD62L, CD70, CD71, CD72, CD74, CD79a, CD79b, CD80, CD90, CD97, CD125, CD138, CD141, CD147, CD152, CD154, CD326, CEA, CEACAM5, CFTR, CLDN3, CLDN18.2, CLDN18.1, CLDN6, CLEC12A, CLL-1, cll3, c-MET, Factor de crecimiento de Crypto 1, CS1, CTLA-4, CXCR2, CXORF61, Ciclina B1, CYP1B1, 15 Cadherina-3, Cadherina-6, DLL3, E7, EDNRB, EFNA4, EGFR, EGFRvIII, ELF2M, EMR2, ENPP3, EPCAM, EphA2, Efrina A4, Efrina B2, EPHB4, ERBB2 (Her2/neu), ErbB3, ERG (gen de fusión de ETS TMPRSS2), ETBR, ETV6-AML, FAP, FCAR, FCRL5, FGFR1, FGFR2, FGFR3, FGFR4, FLT3, Receptor alfa de folato, receptor beta de 20 folato, FOLR1, Antígeno relacionado con Fos 1, Fucosil GM1, GCC, GD2, GD3, GM3, GPC1, GPC2, GPC3, GPNMB, GPR20, GPRC5D, GUCY2C, HAVCR1, HER2, HER3, HGF, HMI.24, HMWMAA, VPH E6, hTERT, ICAM, ICOS-L, Receptor de IGF-I, IGLL1, receptor de IL-2, receptor de IL-4, IL-13Ra2, IL-1 1Ra, receptor de 25 interferón, integrinas (incluyendo α_4 , $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$, $\alpha_v\beta_6$, $\alpha_1\beta_4$,

$\alpha_4\beta_1$, $\alpha_4\beta_7$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_4$, $\alpha_{11b}\beta_3$ integrinas), KIT, LAGE-1a, LAIR1, LAMP-1, LCK, LFA-1 (CD11a), L-selectina (CD62L), LILRA2, LIV-1, LMP2, LRRC15, LY6E, LY6K, LY75, MAD-CT-1, MAD-CT-2, MAGO A1, MelanA/MART1, Mesotelina, ML-IAP, MSLN, mucina, MUC1, MUC16, MYCN, miostatina, NA17, NCA-90, NCAM, NOTCH1, NOTCH2, NOTCH3, NOTCH4, NY-BR-1, NY-ESO-1, OR51E2, OY-TES1, p53, mutante p53, PANX3, PAP, PAX3, PAX5, p-CAD, PD-L1, PD-L2, PDGFR, PDGFR-beta, PIK3CA, PLAC1, Ácido polisiálico, PRSS21, PSCA, PSMA, PTK7, RAGE-1, STEAP1, TAG72, LONA, TCR β , TEM1/CD248, TEM7R, TGF-1, TGF- β 2, TGS5, Tie 2, TIM-1, Tn Ag, TRAC, TRAIL-R1, TRAIL-R2, TROP-2, TRP-2, TRPV1, TSHR, antígeno tumoral CTAA16.88, UPK2, VEGF, VEGFR1, VEGFR2, vimentina, WT1, XAGE1, o combinaciones de estos. Los ejemplos de anticuerpos para usarse con relación al método divulgado en la presente incluyen, pero no se limitan a, Rituximab, Cetuximab, Trastuzumab, Panitumumab, Ofatumumab, Brentuximab, Pertuzumab, Ado-trastuzumab emtansine, Obinutuzumab, Nimotuzumab, Bevacizumab, Alemtuzumab, Gemtuzumab, Ranibizumab, Olaratumab, Ontuximab, Isatuximab, Sacituzumab, Daratumumab, Lintuzumab, Balantamab, Indatuximab, Dinutuximab, Alemtuzumab, Ibritumomab, Tositumomab, Panitumumab, Tremelimumab, Ticilimumab, Catumaxomab, Oregovomab, Zolbetuximab (descrito en, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional núm. WO 2016166124, incorporada por la presente como referencia en su totalidad y

particularmente con respecto a la descripción de Zolbetuximab), ASP1650 (descrita en, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional núm. WO 2012156018, incorporada por la presente como referencia en su totalidad y particularmente con respecto a la descripción de las SEQ ID NO: 35 y 36, las secuencias de CDR dentro de las SEQ ID NO: 35 y 36, y SEQ ID NO: 27 y 25), mAb ASP1893 (una versión humanizada de ASP1650 (es decir, que comparte las secuencias de CDR de ASP1650)), y Veltuzumab. Los ejemplos adicionales de anticuerpos incluyen, pero no se limitan a, Adalimumab, Eculizumab, y Natalizumab. En algunos aspectos, el anticuerpo es Rituximab, mAb de ASP1893, ASP1650, o Zolbetuximab.

[00076] Por ejemplo, la divulgación proporciona un método para tratar una enfermedad o un trastorno en un sujeto en necesidad de esto, el método que comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la población de células NK modificadas descritas en la presente y administrar además al sujeto un anticuerpo que se une a un antígeno de superficie celular en una célula diana, la eliminación de la cual proporciona un beneficio terapéutico al sujeto. En varios aspectos, la divulgación proporciona un método para tratar el cáncer en un sujeto en necesidad de esto, en donde el método comprende administrar al sujeto una cantidad efectiva de la población de células NK modificadas y una cantidad efectiva de anticuerpo específico para un antígeno de célula de cáncer

(tal como cualquiera de los anticuerpos anti-cáncer descritos en la presente). En diversos aspectos de la divulgación, una cantidad efectiva se refiere a tratar el cáncer en un paciente por la administración de múltiples dosis y/o

5 múltiples rondas de dosis de células NK y anticuerpos como un curso de tratamiento. Como simplemente ejemplos de aspectos de la divulgación, el sujeto puede sufrir de cáncer de mama, y las células NK se administran con un anticuerpo anti-HER2 (tal como Trastuzumab); o el sujeto puede padecer de

10 carcinoma de colon, y las células NK se administran con un anticuerpo anti-EGFR (tal como cetuximab o panitumumab); o el sujeto puede sufrir de AML, y las células NK se administran con un anticuerpo anti-CD123 o un anticuerpo anti-FLT3. El sujeto puede padecer de un cáncer positivo para CD20. En

15 diversos aspectos, el sujeto está padeciendo de un cáncer positivo para CLDN18.2, tal como adenocarcinoma de unión gástrica o gastroesofágica (GEJ), y las células NK se administran con un anticuerpo anti-CLDN18.2. De manera alternativa, el sujeto puede sufrir de un cáncer positivo

20 para CLDN6 (por ejemplo, cáncer de ovario, en particular adenocarcinoma de ovario o teratocarcinoma de ovario, cáncer de pulmón, que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas (SCLC) y cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), en particular carcinoma de pulmón de células escamosas y

25 adenocarcinoma, cáncer gástrico, cáncer de mama, cáncer

hepático, cáncer pancreático, cáncer de piel, en particular
 carcinoma de células basales o carcinoma de células
 escamosas, melanoma maligno, cáncer de cabeza y cuello, en
 particular adenoma pleomórfico maligno, sarcoma, en
 5 particular sarcoma sinovial o carcinosarcoma, cáncer del
 conducto biliar, cáncer de la vejiga urinaria, en particular
 carcinoma de células transicionales y carcinoma papilar,
 cáncer de riñón, en particular carcinoma de células renales
 que incluye carcinoma de células renales de células claras o
 10 carcinoma de células renales papilares, cáncer de colon,
 cáncer de intestino delgado, que incluye cáncer del íleon, en
 particular adenocarcinoma de intestino delgado y
 adenocarcinoma del íleon, carcinoma embrionario testicular,
 coriocarcinoma placentario, cáncer cervical, cáncer
 15 testicular, en particular seminoma testicular, teratoma
 testicular, y cáncer testicular embrionario, cáncer uterino,
 un tumor de células germinales tal como un teratocarcinoma o
 un carcinoma embrionario, en particular una célula germinal
 tumor del testículo, y las formas metastásicas de los
 20 mismos), y las células NK se administran con un anticuerpo
 anti-CLDN6. Opcionalmente, el anticuerpo es Rituximab,
 Zolbetuximab, mAb de ASP1893, o ASP1650.

[00077] En varios aspectos, la divulgación proporciona un
 método para tratar una condición autoinmunitaria en un sujeto
 25 en necesidad de esto, en donde el método comprende

administrar al sujeto una cantidad efectiva de la población de células NK modificadas y una cantidad efectiva de anticuerpo específico para un antígeno de célula inmunitaria. Opcionalmente, el anticuerpo es Rituximab.

5 **[00078]** En algunos aspectos de la divulgación, las células NK modificadas se coadministran opcionalmente con un anticuerpo como parte de un régimen de tratamiento que puede incluir opcionalmente un tratamiento quimioterapéutico que no es un anticuerpo. Opcionalmente, el agente quimioterapéutico
10 se selecciona de fluorouracilo, oxaliplatino, y/o capecitabina.

[00079] Como se utiliza en la presente, el término "tratar", así como las palabras relacionadas con este, no implican necesariamente 100% o tratamiento completo o
15 remisión. En su lugar, hay diversos grados de tratamiento de los cuales un experto en la técnica reconoce que tienen un beneficio potencial o efecto terapéutico. Con respecto a esto, los métodos para tratar una enfermedad o trastorno pueden proporcionar cualquier cantidad o cualquier nivel de
20 tratamiento. Además, el tratamiento proporcionado por el método puede incluir tratamiento de una o más condiciones o síntomas o signos de la enfermedad que se está tratando. Por ejemplo, el método de tratamiento de la presente divulgación puede inhibir uno o más síntomas de la enfermedad. Además, el
25 tratamiento proporcionado por los métodos de la presente

divulgación puede abarcar ralentizar la progresión de la enfermedad.

[00080] El tratamiento para el cáncer se puede determinar de cualquiera de una cantidad de maneras. Se contempla cualquier mejora en el bienestar del sujeto (por ejemplo, al menos o aproximadamente una reducción del 10%, al menos o aproximadamente una reducción del 20%, al menos o aproximadamente una reducción del 30%, al menos o aproximadamente una reducción del 40%, al menos o aproximadamente una reducción del 50%, al menos o aproximadamente una reducción del 60%, al menos o aproximadamente una reducción del 70%, al menos o aproximadamente una reducción del 80%, al menos o aproximadamente una reducción del 90%, o al menos o aproximadamente una reducción del 95% de cualquier parámetro descrito en la presente). Por ejemplo, una respuesta terapéutica se referiría a una o más de las siguientes mejoras en la enfermedad: (1) una reducción en el número de células neoplásicas; (2) un incremento en la muerte celular neoplásica; (3) inhibición de la supervivencia celular neoplásica; (5) inhibición (es decir, ralentización en cierta medida, preferentemente detención) del crecimiento tumoral o aparición de nuevas lesiones; (6) disminución en el tamaño o la carga tumoral (es decir, carga); (7) ausencia de enfermedad clínicamente detectable, (8) disminución en los

niveles de marcadores de cáncer; (9) un tasa de supervivencia o tiempo de supervivencia incrementado del paciente; y/o (10) algún alivio de uno o más síntomas asociados con la enfermedad o condición (por ejemplo, dolor).

5 **[00081]** Por ejemplo, en varios aspectos, la administración de las células NK modificadas de la divulgación incrementa el tiempo de supervivencia del sujeto por al menos 20 días (por ejemplo, al menos 30 días, al menos 45 días, al menos 60 días, al menos 90 días, o más) con relación al tiempo de supervivencia del sujeto en la ausencia de administración de la población de células NK modificadas. De manera alternativa o además, la administración de las células NK al sujeto disminuye la carga tumoral en el sujeto. En varios aspectos, los métodos de la divulgación comprenden además monitorear el tratamiento en el sujeto. Los estados de enfermedad se pueden monitorear, por ejemplo, por examen clínico, rayos X, tomografía computarizada (CT, tal como CT espiral), imagenología por resonancia magnética (IRM), tomografía por emisión de positrones (PET), ultrasonido, endoscopia y laparoscopia, niveles de marcadores tumorales en el contexto del cáncer (por ejemplo, antígeno carcinoembrionario (CEA)), citología, histología, muestreo por biopsia, y/o conteo de células diana en circulación. Otros métodos y criterios conocidos en el campo incluyen, por ejemplo, RECIST (Criterios de Evaluación de Respuesta en Tumores Sólidos) e

10

15

20

25

irRC (criterios de respuesta inmunitaria). El término "cantidad efectiva" se refiere a una cantidad suficiente de células NK (o coterapia, tal como terapia de anticuerpos) para lograr una respuesta biológica deseada en un período de tiempo clínicamente pertinente; por ejemplo, "terapéuticamente efectiva" se refiere a una cantidad suficiente de células NK que mejora una o más causas o síntomas de una condición o enfermedad. La cantidad de células NK modificadas administradas a un sujeto puede comprender, por ejemplo, una dosis de 10^4 a 10^{11} , 10^5 a 10^{10} , o 10^6 a 10^9 células/kg de peso corporal.

[00082] El sujeto es un mamífero, incluyendo, pero no limitado a, mamíferos del orden Rodentia, tal como ratones y hámsteres; mamíferos del orden Logomorpha, tal como conejos; mamíferos del orden Carnivora, incluyendo Felinos (gatos) y Caninos (perros); mamíferos del orden Artiodactyla, incluyendo Bovinos (vacas) y Porcinos (cerdos); o del orden Perssodactyla, incluyendo Equinos (caballos). En algunos aspectos, el mamífero es del orden Primate, Ceboide, o Simoide (mono) o del orden Antropoide (humanos y simios). En algunos aspectos, el mamífero es un ser humano. Los términos "sujeto en necesidad de ello" incluyen sujetos ya afligidos con una enfermedad o trastorno, así como aquellos en los que la enfermedad o trastorno se va a prevenir.

[00083] La divulgación también proporciona un método para

producir células asesinas naturales (NK) derivadas de células madre pluripotentes (PS) en condiciones libres de alimento, opcionalmente libres de suero. El método comprende (a) cultivar células madre pluripotentes, opcionalmente las PSC

5 se modifican genéticamente para interrumpir una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de B2M endógena y/o una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de un gen relacionado con HLA de clase II seleccionado del grupo que consta de RFXANK, RFX5, RFXAP, y CIITA, y opcionalmente expresa una

10 proteína HLA de clase I no clásica modificada asociada con B2M, por ejemplo, HLA-E; (b) diferenciar las células madre pluripotentes en células precursoras capaces de diferenciarse en tipos de células hematopoyéticas, tipos de células endoteliales, y/o derivados mesodérmicos; y (c) diferenciar

15 las células precursoras en células NK en condiciones libres de alimentador, opcionalmente libres de suero, en un medio de cultivo que comprende SCF, IL-7, IL-15, y Flt3L (ligando de Flt3). En diversos aspectos, el paso (b) comprende diferenciar las células madre pluripotentes usando cuerpos

20 embrioides para obtener células precursoras capaces de diferenciarse a tipos de células hematopoyéticas, tipos de células endoteliales, y/o derivados mesodérmicos. En diversos aspectos, el PSC es un PSC humano. En otros diversos aspectos, el método comprende además (d) cultivar las células

25 NK en un medio de cultivo que comprende IL-15 e IL-18 (y,

opcionalmente, IL-21). En varios aspectos, el paso (d) comprende cultivar las células NK en la presencia de un anticuerpo o ligando que se une a un receptor en células NK para promover la activación y/o expansión de las células NK.

5 En diversos aspectos, el anticuerpo o ligando se une a ADNM-1, OX40, NKG2D, 2B4, NKp30, o NKp46. Opcionalmente, el método comprende cultivar las células NK en la presencia de un anticuerpo que se une a DNAM-1, un anticuerpo que se une a OX40, un anticuerpo que se une a NKG2D, un anticuerpo que se

10 une a 2B4, un anticuerpo que se une a NKp30, y/o un anticuerpo que se une a NKp46; una combinación de cualquiera de los anticuerpos anteriores se puede proporcionar durante el paso de cultivo. De manera alternativa, el método puede comprender cultivar las células NK en la presencia de un

15 ligando que se une a la Molécula Accesorio de ADN 1 (ADNM-1), un ligando que se une a OX40 (por ejemplo, OX40L), un ligando que se une al Grupo citolítico natural 2D (NKG2D) (por ejemplo, proteína A relacionada con la cadena de MHC clase I (MICA) o proteína de unión a UL16 1 (ULBP1)), un

20 ligando que se une a 2B4 (CD244), un ligando que se une a la Proteína citolítica natural 30 (NKp30) (por ejemplo, B7H6), y/o un ligando que se une a la Proteína citolítica Natural 46 (NKp46, CD355), para activar y/o expandir la célula NK. Se puede proporcionar una combinación de cualquiera de los

25 ligandos anteriores durante el paso de cultivo.

Opcionalmente, el ligando comprende al menos la porción de un ligando nativo que media la unión y activación de receptor fusionado a un dominio Fc.

[00084] En diversos aspectos, el método descrito en la presente es particularmente adecuado para la producción a gran escala de células NK derivadas de PSC humanas. Los métodos anteriores de producción de NK en condiciones libres de alimentador permitieron una expansión de hasta 5 a 500 veces de células PBNK. Ver, por ejemplo, Lu et al., J. Hematol. Oncol. 14:7 (2021). De manera notable, el método de la divulgación permite al menos una expansión de 1000 veces de las células. De hecho, el método de la divulgación permite, en algunas modalidades, al menos una expansión de 2000 veces, al menos una expansión de 3000 veces, al menos una expansión de 4000 veces, al menos una expansión de 5000 veces, al menos una expansión de 6000 veces, al menos una expansión de 7000 veces, al menos una expansión de 8000 veces, al menos una expansión de 9000 veces, o al menos una expansión de 10,000 veces (o cualquier intervalo en este que tenga estos valores como puntos finales). El nivel de expansión logrado en condiciones libres de alimentador usando los materiales y métodos descritos en la presente es superior a los métodos anteriores.

[00085] El método para producir células NK modificadas derivadas de PSC humanas se realiza bajo "condiciones libres

de alimentador". "Alimentadores" son células a menudo cocultivadas con células de interés, por ejemplo, células PSC y/o NK; células alimentadoras que liberan factores de crecimiento y nutrientes en el medio celular que soportan y promueven el crecimiento de células diana (por ejemplo, PSC). Los tipos de células utilizados como células alimentadoras incluyen, por ejemplo, fibroblastos (de ratón o humanos), así como células endoteliales y otras células estromales (por ejemplo, células OP9). Las condiciones libres de alimentador se refieren a condiciones de cultivo (o medios) esencialmente libres de células alimentadoras (por ejemplo, estromales) y/o que no han sido preacondicionadas por el cultivo de células alimentadoras. El método de la divulgación proporciona sorprendentemente una población robusta de células NK sin la necesidad de células alimentadoras o medio acondicionado por células alimentadoras. De hecho, incluso cuando se compara con los métodos de producción de NK en condiciones de alimentador, el método de la presente divulgación permite una producción comparable a la de NK. El uso de condiciones libres de alimentadores es rentable y minimiza los contaminantes xenogénicos.

[00086] "Cultivo" se refiere a mantener una célula en medio de cultivo en condiciones adecuadas para la supervivencia y/o proliferación de la célula. Los pasos descritos en la presente se pueden realizar utilizando cualquier recipiente

adecuado (por ejemplo, placa de micropocillo, matraz, biorreactor, etc.) y condiciones ambientales que permitan el crecimiento y la diferenciación celular. Cualquier medio de cultivo celular adecuado para el crecimiento y la

5 diferenciación de células madre se puede utilizar en el método. Los ejemplos de medios incluyen, pero no se limitan a, mTeSR^{MR}1, TeSR^{MR}2, mTeSR^{MR} Plus, TeSR^{MR}E8, APEL^{MR}, STEMdiff^{MR} APEL^{MR}2, o StemSpan^{MR} de STEMCELL Technologies (Vancouver, Canadá), medio de células ES/iPS de primate de ReproCELL

10 (Boston, MA), y StemPro^{MR}-34 y StemPro^{MR} hESC SFM de Invitrogen (Carlsbad, CA), medios Gibco^{MR} PFHM-II de ThermoFisher Scientific (Waltham, MA), y X-VIVO^{MR} de Lonza (Basilea, Suiza). El medio comprende opcionalmente

15 suplementos tal como, por ejemplo, aminoácidos (por ejemplo, glutamina, arginina, o asparagina), hidrolizado, vitaminas, nucleósidos, hormonas y/u otros factores de crecimiento (tal como insulina, transferrina, factor de crecimiento tipo

20 amortiguadores, moléculas pequeñas (por ejemplo, un inhibidor de GSK-3, un inhibidor de MEK, o un inhibidor de Rho cinasa (ROCK)), y/o azúcar(es) (por ejemplo, glucosa o galactosa). También se contempla el medio que carece de uno o más de

25 estos suplementos. En diversos aspectos, el medio es un medio químicamente definido, es decir, medio de cultivo celular en

el que se conocen todos los componentes químicos, y que habitualmente no incluyen suero, albúmina de suero e hidrolizado.

[00087] El método comprende cultivar células madre pluripotentes humanas, opcionalmente, genéticamente modificadas para interrumpir una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de B2M endógena y/o una o más copias (por ejemplo, todas las copias) de RFXANK, RFX5, RFXAP, o CIITA (o una combinación de las mismas), y opcionalmente expresar una proteína HLA de clase I no clásica modificada asociada con B2M, por ejemplo, HLA-E, como se describe anteriormente con respecto a la generación de una población de células NK. La divulgación relacionada con PSC y células NK proporcionada anteriormente también se aplica a la PSC para uso en el método. Por ejemplo, las PSC humanas comprenden opcionalmente una molécula de ácido nucleico que codifica para uno o más productos génicos suicidas que pueden estar presentes en una o más copias, tal como timidina cinasa de HSV, y son opcionalmente células madre embrionarias o células PS inducidas, como se describe anteriormente.

[00088] Se puede emplear cualquier densidad de siembra inicial adecuada para establecer un cultivo para la diferenciación. Por ejemplo, se puede utilizar una densidad de siembra inicial de aproximadamente 0.5×10^5 a aproximadamente 10×10^5 células madre pluripotentes

humanas/mL, (por ejemplo, aproximadamente 1×10^5 a aproximadamente 5×10^5 o aproximadamente 1.5×10^5 a aproximadamente 3.5×10^5 o aproximadamente 2×10^5 a aproximadamente 2.5×10^5 células/mL). Las células madre pluripotentes humanas se pueden cultivar durante cualquier cantidad de tiempo adecuada antes del primer paso de diferenciación, por ejemplo, de uno a siete días (tal como de uno a cuatro días o de uno a tres días), para proporcionar una cantidad suficiente de células madre pluripotentes humanas adecuadas para la diferenciación. El método comprende entonces diferenciar las células madre pluripotentes humanas para generar células precursoras capaces de diferenciarse en tipos de células hematopoyéticas, tipos de células endoteliales, y/o derivados mesodérmicos. En diversos aspectos, las células madre pluripotentes se diferencian en células precursoras usando cuerpos embrioides (EB). Ver, por ejemplo, Itskovitz-Eldor et al., Mol Med., 6(2): 88-95 (2000), incorporada en la presente como referencia en su totalidad. Los EB son agregados o agrupaciones de células multipotentes. Los EB se pueden emplear como una etapa intermedia en la producción de células precursoras con el potencial de diferenciarse adicionalmente en tipos de células hematopoyéticas, tipos de células endoteliales, y/o derivados mesodérmicos (o como una etapa intermedia en la producción de tipos de células hematopoyéticas, tipos de células

endoteliales, y/o derivados mesodérmicos en sí mismos). En diversos aspectos, el método no comprende diferenciar las células madre pluripotentes humanas en células formadoras de hemangioblastos o hemangiocolonias como células precursoras.

- 5 **[00089]** La paso de diferenciación para producir células precursoras comprende cultivar las PSC humanas en condiciones adecuadas para producir las células precursoras (por ejemplo, usando EB). En aspectos de ejemplo, las células madre pluripotentes humanas se cultivan en medio que comprende
- 10 citocinas que promueve la formación de EB. En diversos aspectos, el medio comprende al menos una de proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) o factor de células madre (SCF). Se contemplan combinaciones de BMP4, SCF, y VEGF, incluyendo el
- 15 uso de las tres citocinas para inducir la diferenciación. Las citocinas se pueden utilizar en cualquier cantidad adecuada. Por ejemplo, se puede proporcionar aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 40 ng/mL de BMP4 (por ejemplo, se puede proporcionar aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente 35
- 20 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL a aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 16 ng/mL, aproximadamente 17 ng/mL, aproximadamente 18 ng/mL, aproximadamente 19 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 21 ng/mL,
- 25 aproximadamente 22 ng/mL, aproximadamente 23 ng/mL, o

aproximadamente 24 ng/mL de BMP4). Opcionalmente, se puede proporcionar de aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 40 ng/mL de VEGF (por ejemplo, se proporciona de aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente 35 ng/mL, de aproximadamente 10

5 ng/mL a aproximadamente 30 ng/mL, de aproximadamente 15 ng/mL a aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 16 ng/mL, aproximadamente 17 ng/mL, aproximadamente 18 ng/mL, aproximadamente 19 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 21 ng/mL, aproximadamente 22 ng/mL,

10 aproximadamente 23 ng/mL, o aproximadamente 24 ng/mL de VEGF). También, opcionalmente, se puede proporcionar aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 60 ng/mL de SCF (por ejemplo, se proporciona aproximadamente 25 ng/mL a aproximadamente 55 ng/mL, aproximadamente 30 ng/mL a

15 aproximadamente 50 ng/mL, aproximadamente 35 ng/mL a aproximadamente 45 ng/mL, aproximadamente 36 ng/mL, aproximadamente 37 ng/mL, aproximadamente 38 ng/mL, aproximadamente 39 ng/mL, aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 41 ng/mL, aproximadamente 42 ng/mL,

20 aproximadamente 43 ng/mL, o aproximadamente 44 ng/mL de SCF). En diversos aspectos, el método comprende exponer las células madre pluripotentes humanas al factor de crecimiento de fibroblastos (FGF, tal como bFGF); alternativamente, el método no comprende el uso de FGF (por ejemplo, bFGF). El

25 paso de diferenciación se puede realizar durante cualquier

cantidad de tiempo adecuada, por ejemplo, de aproximadamente un día a aproximadamente 21 días, tal como de aproximadamente un día a aproximadamente 14 días, de aproximadamente 7 días a aproximadamente 18 días, de aproximadamente 10 días a aproximadamente 14 días, o aproximadamente 14 días. En varios aspectos, el primer paso de diferenciación se realiza hasta aproximadamente 14 días. El medio se puede cambiar periódicamente durante el período de cultivo de paso de diferenciación. En general, al menos una porción del medio (por ejemplo, la mitad del medio) se intercambia cada dos días hasta el final del paso de diferenciación. Las condiciones descritas en la presente dan por resultado EB de alta calidad, que conducen a una mejor diferenciación y rendimiento de células NK.

[00090] El método comprende además diferenciar las células precursoras (por ejemplo, usando EB) a células NK en condiciones libres de alimentador, opcionalmente libres de suero, en un medio de cultivo que comprende SCF, IL-7, IL-15, y Flt3L (es decir, paso (c) o segundo paso de diferenciación). En diversos aspectos, las células precursoras se recolectan y se vuelven a fijar en placa en un recipiente adecuado para el crecimiento, la expansión, y la diferenciación. Las células recolectadas se cultivan en medio que comprende SCF (por ejemplo, aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente 40 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL a

aproximadamente 35 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL a
aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL a
aproximadamente 25 ng/mL, aproximadamente 16 ng/mL,
aproximadamente 17 ng/mL, aproximadamente 18 ng/mL,
5 aproximadamente 19 ng/mL, aproximadamente 20 ng/mL,
aproximadamente 21 ng/mL, aproximadamente 22 ng/mL,
aproximadamente 23 ng/mL, o aproximadamente 24 ng/mL de SCF),
IL-7 (por ejemplo, aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente
40 ng/mL, aproximadamente 10 ng/mL a aproximadamente 35
10 ng/mL, aproximadamente 15 ng/mL a aproximadamente 30 ng/mL,
aproximadamente 15 ng/mL a aproximadamente 25 ng/mL,
aproximadamente 16 ng/mL, aproximadamente 17 ng/mL,
aproximadamente 18 ng/mL, aproximadamente 19 ng/mL,
aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 21 ng/mL,
15 aproximadamente 22 ng/mL, aproximadamente 23 ng/mL, o
aproximadamente 24 ng/mL de IL-7), IL-15 (por ejemplo,
aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 30 ng/mL,
aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente 20 ng/mL,
aproximadamente 7 ng/mL a aproximadamente 15 ng/mL,
20 aproximadamente 9 ng/mL a aproximadamente 12 ng/mL,
aproximadamente 10 ng/mL de IL-15), y Flt3L (por ejemplo,
aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 30 ng/mL,
aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente 20 ng/mL,
aproximadamente 7 ng/mL a aproximadamente 15 ng/mL,
25 aproximadamente 9 ng/mL a aproximadamente 12 ng/mL, o

aproximadamente 10 ng/mL de Flt3L). El segundo paso de diferenciación se puede realizar durante cualquier cantidad de tiempo adecuada, por ejemplo, de aproximadamente un día a aproximadamente 35 días, tal como de un día a aproximadamente 21 días, de aproximadamente 7 días a aproximadamente 32 días, de aproximadamente 10 días a aproximadamente 28 días, de aproximadamente 14 días a aproximadamente 25 días, o aproximadamente 21 días. En diversos aspectos, este paso se realiza hasta aproximadamente 21 días. El medio se pueden cambiar periódicamente durante el período de cultivo de segundo paso de diferenciación. En algunos aspectos, el cultivo no se altera durante un período de tiempo inicial (por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro días calculados desde el inicio del paso de diferenciación), aunque esto no se requiere. Al menos una porción del medio (por ejemplo, la mitad del medio) se puede intercambiar cada dos días, dos veces por semana, una vez por semana, etc. hasta el final del paso de diferenciación.

[00091] En diversos aspectos, IL-3 se incluye en el medio durante el segundo paso de diferenciación. En este sentido, opcionalmente se proporciona aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 10 ng/mL de IL-3 (por ejemplo, se proporciona aproximadamente 3 ng/mL a aproximadamente 8 ng/mL, aproximadamente 4 ng/mL a aproximadamente 6 ng/mL, aproximadamente 2 ng/mL, aproximadamente 3 ng/mL,

aproximadamente 4 ng/mL, aproximadamente 5 ng/mL, aproximadamente 6 ng/mL, aproximadamente 7 ng/mL, aproximadamente 8 ng/mL, o aproximadamente 9 ng/mL de IL-3). IL-3 se proporciona opcionalmente sólo durante una porción
5 del período de cultivo de segundo paso de diferenciación, por ejemplo, sólo durante el primer uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, o siete días de cultivo, y no se incluye en el medio durante el tiempo restante de segundo paso de diferenciación (NK).

10 **[00092]** En un aspecto preferido de la divulgación, el medio de cultivo del segundo paso de diferenciación (paso (c), diferenciación de células precursoras a células NK) comprende UM171. Se puede emplear cualquier cantidad adecuada de UM171 para lograr un efecto deseado; habitualmente se emplea de
15 aproximadamente 10 nM a aproximadamente 60 nM (por ejemplo, de aproximadamente 15 nM a aproximadamente 55 nM, de aproximadamente 20 nM a aproximadamente 50 nM, de aproximadamente 25 nM a aproximadamente 45 nM, de aproximadamente 30 nM a aproximadamente 40 nM,
20 aproximadamente 31 nM, aproximadamente 32 nM, aproximadamente 33 nM, aproximadamente 34 nM, aproximadamente 35 nM, aproximadamente 36 nM, aproximadamente 37 nM, aproximadamente 38 nM, o aproximadamente 39 nM). UM171 es un derivado de pirimido-indol que incrementa significativamente el
25 rendimiento de células NK (es decir, la expansión de células

NK) y reduce la variabilidad en la población de NK resultante. Por lo tanto, se puede lograr una población sustancialmente homogénea de células NK sin la necesidad de purificación o filtración del producto final de células NK.

5 El término "homogéneo" se refiere a una población de células en donde cada célula es la misma o sustancialmente la misma que las otras células en la población (es decir, expresa uno o más de los mismos marcadores de superficie celular indicativos de células NK, tal como CD56, CD45, CD25, DNAM-1,
10 NKp30, NKG2D, y/o NKp44). En varios aspectos del método, al menos 90%, al menos 95%, al menos 96%, al menos 97%, al menos 98%, al menos 99%, o más de las células de la población de células NK modificadas derivadas de células madre pluripotentes humanas resultantes son iguales o
15 sustancialmente iguales a otras células en la población (por ejemplo, muestran uno o más de los marcadores de superficie celular anteriores). En este sentido, la divulgación contempla un método que no comprende un paso de purificación, aislamiento, o filtración después de la diferenciación de las
20 células precursoras a células NK (u opcionalmente después del paso de cultivo de las células NK para promover la activación) para remover los tipos de células no deseadas. En varios aspectos, UM171 está presente sólo en el medio de cultivo del paso (c) y no está presente en el medio de
25 cultivo de ningún otro paso del método (aunque esto no se

requiere).

[00093] El método de la descripción comprende opcionalmente un paso de cultivo adicional (paso (d)) para promover la activación y/o expansión de las células NK. En tanto que este

5 paso no es necesaria, puede ser deseable proporcionar una población de células NK con características particularmente deseables (por ejemplo, citotoxicidad mejorada, persistencia mejorada *in vivo*, injerto mejorado, etc.). El paso de activación comprende cultivar las células NK (del segundo

10 paso de diferenciación, paso (c)) en un medio de cultivo que comprende IL-15 e IL-18. IL-15 e IL-18 se pueden proporcionar en cualquier cantidad adecuada, que incluye, por ejemplo, aproximadamente 1ng/mL a aproximadamente 30ng/mL, aproximadamente 5ng/mL a aproximadamente 20ng/mL,

15 aproximadamente 7ng/mL a aproximadamente 15ng/mL, aproximadamente 9ng/mL a aproximadamente 12ng/mL, o aproximadamente 10ng/mL de cada uno de IL-15 e IL-18. Opcionalmente, las células NK se cultivan en la presencia de IL-15, IL-18 e IL-21 durante al menos una porción del paso de

20 activación (paso (d)). Las cantidades adecuadas de IL-21 incluyen, pero no se limita a, aproximadamente 1 ng/mL a aproximadamente 30 ng/mL, aproximadamente 5 ng/mL a aproximadamente 20 ng/mL, aproximadamente 7 ng/mL a aproximadamente 15 ng/mL, aproximadamente 9 ng/mL a

25 aproximadamente 12 ng/mL, o aproximadamente 10 ng/mL de IL-

21). En diversos aspectos, el medio de cultivo utilizado en el paso de activación no comprende IL-12.

[00094] En varios aspectos, las células NK se cultivan en presencia de un anticuerpo que se une a DNAM-1 (molécula accesorio de DNAX, CD222), un anticuerpo que se une a OX40, un anticuerpo que se une a NKG2D, un anticuerpo que se une a 2B4, un anticuerpo que se une a NKp30, un anticuerpo que se une a NKp46, o una combinación de cualquiera de los anticuerpos anteriores. Por ejemplo, el paso (d) puede comprender cultivar las células NK en la presencia de un anticuerpo que se une a NKp30. NKp30 también se denomina como CD337 y es una proteína transmembrana de tipo I de 30 kD que es un receptor estimulador en células NK. De manera alternativa o además, el paso (d) puede comprender cultivar la célula NK en la presencia de un anticuerpo que se une a 2B4. 2B4, también se denomina como CD244, es un miembro de la familia de moléculas de activación de linfocitos de señalización (SLAM) que media la aniquilación no restringida por MHC. De manera alternativa o además, el paso (d) puede comprender cultivar la célula NK en la presencia de un anticuerpo que se une a DNAM-1. DNAM-1 también se denomina como CD226 y es un miembro de glicoproteína de 65 kD de la superfamilia de Ig expresada en la superficie de células NK, células T, y monocitos/macrófagos. Por ejemplo, el paso (d) puede comprender cultivar la célula NK en la presencia de un

anticuerpo que se une a NKp30 y un anticuerpo que se une a 2B4. En un ejemplo adicional, el paso (d) puede comprender cultivar la célula NK en la presencia de un anticuerpo que se une a NKp30 y un anticuerpo que se une a DNAM-1. Los anticuerpos anti-NKp30, anticuerpos de 2B4, y anticuerpos anti-DNAM-1 están comercialmente disponibles de, por ejemplo, SinoBiological (Wayne, PA) y BioLegend (San Diego, CA). En varios aspectos, el paso (d) puede comprender cultivar las células NK en la presencia de un ligando que se une a DNAM-1, un ligando que se une a OX40 (por ejemplo, OX40L), un ligando que se une a NKG2D (por ejemplo, MICA o ULBP1), un ligando que se une a 2B4 (CD244), un ligando que se une a NKp30 (por ejemplo, B7H6), y/o un ligando que se une a NKp46, para activar la célula NK. Se puede proporcionar una combinación de cualquiera de los ligandos anteriores durante el paso de cultivo. El anticuerpo, anticuerpos, ligando, o ligandos se pueden proporcionar en el medio de cultivo o se pueden recubrir en el recipiente.

[00095] El paso de activación (paso (d)) se puede realizar durante cualquier cantidad de tiempo adecuada, por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho, nueve, 10, 11, 12, 13, o 14 días. En diversos aspectos, el paso (d) se realiza durante aproximadamente cinco días a aproximadamente 10 días. Adicionalmente, el paso de activación se puede realizar en múltiples vasos para acomodar la proliferación de

la población de células NK. Por ejemplo, el paso de activación puede comprender cultivar las células NK en un recipiente (por ejemplo, un matraz, tal como un matraz T75) durante un período de tiempo inicial (por ejemplo, uno, dos, 5 tres, o cuatro días), entonces transferir las células a un recipiente más grande (por ejemplo, un biorreactor) durante un segundo período de tiempo (por ejemplo, uno, dos, tres, o cuatro días). Además, en varios aspectos, IL-21 se proporciona sólo para una porción del paso de activación, 10 cuando está presente en absoluto. Con respecto a esto, el método puede comprender la inclusión de IL-21 en el medio de cultivo durante un período de tiempo inicial (por ejemplo, uno o más de los días 0-4 del paso de activación), pero no incluye IL-21 en el medio de cultivo durante el resto del 15 período de cultivo.

[00096] Las células NK se cultivan en un recipiente (por ejemplo, matraz o biorreactor) adecuado para el crecimiento, la expansión, y la activación de las células NK. El recipiente se recubre opcionalmente con una sustancia que 20 promueve la adhesión celular o uno o más componentes de matriz, tal como laminina o fragmentos de laminina, entactina, colágeno, gelatina, vitronectina, fibronectina, Synthemax^{MR} (Corning Incorporated), Matrigel^{MR}, polilisina, trombospondina, ProNectin-F^{MR}, y similares. Un componente de 25 matriz de ejemplo es RetroNectin^{MR}, un fragmento de 63 kD de

fragmento de fibronectina humana recombinante también se denomina en la técnica como rFN-CH-296. Opcionalmente, se proporciona un ligando de Notch, tal como DLL4. En diversos aspectos, el recipiente se recubre con un ligando de Notch, por ejemplo, DLL4, y RetroNectin^{MR}. El DLL4 y RetroNectin^{MR} se pueden proporcionar en cualquier cantidad adecuada, incluyendo cantidades relativas que dan por resultado un DLL4: Relación de RetroNectin^{MR} de 5:1, 4:1, 3:1, 2:1, 1:1, 1:2, 1:3, 1:4, o 1:5. Los recipientes recubiertos se pueden emplear para cualquiera de los pasos del método divulgados en la presente, incluyendo el paso (c) y/o el paso (d).

[00097] Sorprendentemente, se ha determinado que el paso de activación (paso (d)) se puede realizar múltiples veces sin afectar negativamente las características de la población de células NK (por ejemplo, sin reducir significativamente la funcionalidad de las células). Si se desea, el paso (d) puede repetirse hasta cinco veces (es decir, repetirse dos veces, tres veces, cuatro veces, o cinco veces) para expandir y/o activar adicionalmente las células NK.

[00098] En varios aspectos del método, IL-2 y/o IL-6 no se incluye en el medio de cultivo de uno o más (por ejemplo, cualquiera) pasos del método.

[00099] La divulgación proporciona además un método para incrementar la pureza de una población de células NK derivadas de células madre pluripotentes. El método comprende

diferenciar cuerpos embrioides (es decir, diferenciar células dentro de cuerpos embrioides) a células NK en condiciones libres de alimentador, opcionalmente libres de suero, en un medio de cultivo que comprende SCF, IL-7, IL-15, y Flt3L y en la presencia de UM171. En diversos aspectos, el medio de cultivo comprende además IL-3. Opcionalmente, el método se lleva a cabo en un recipiente recubierto con RetroNectin^{MR} y DLL4. También opcionalmente, el método se realiza durante aproximadamente un día a aproximadamente 21 días. El resultado del método es una población sustancialmente pura de células NK CD56+, CD45+ (es decir, una población de células NK con bajos niveles de tipos de células no deseadas (células contaminantes)). El método permite la producción de células NK derivadas de PSC sin la necesidad de una purificación adicional extensa de la población celular resultante para obtener una población sustancialmente pura de células NK. En diversos aspectos, el método da por resultado una población de células en donde al menos aproximadamente 75% de las células son células NK CD56+, CD45+ (por ejemplo, al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%, al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de las células son células NK CD56+, CD45+).

[000100] El método de la divulgación da por resultado una

población robusta de células NK adecuada para usarse en, por ejemplo, aplicaciones terapéuticas. Por ejemplo, las células NK expresan opcionalmente uno o más marcadores de superficie celular seleccionados del grupo que consta de CD56, CD45, CD25, DNAM-1, NKp30, NKG2D, y NKp44, incluyendo cualquier combinación de los marcadores de superficie celular. En un aspecto preferido, las células NK expresan al menos CD56. Las células NK también expresan opcionalmente una proteína HLA de clase I no clásica modificada asociada con B2M, por ejemplo, HLA-E, HLA-F, y/o HLA-G, como se describe anteriormente. Las células NK también se pueden modificar para expresar un CAR (por ejemplo, un CAR universal), un FcR, un receptor de NKG2D no natural u otro tipo de receptor (por ejemplo, como se describe anteriormente). La población de células NK resultante también exhibe preferentemente las características descritas anteriormente, por ejemplo, son capaces de injertarse en un sujeto después de la administración y opcionalmente permanecer injertada durante al menos 20 días, capaz de inducir ADCC y/o NCC de una célula de cáncer, y capaz de disminuir la carga tumoral. En varios aspectos, el método da por resultado la producción de al menos 10^9 , al menos 10^{10} , o al menos 10^{11} células NK positivas para CD56.

[000101] El siguiente ejemplo se proporciona simplemente para ilustrar la presente invención y no de ninguna manera para limitar su alcance.

Ejemplos

[000102] Los ejemplos describen métodos de ejemplo para producir células asesinas naturales (NK) modificadas derivadas de células madre pluripotentes humanas en condiciones libres de suero, libres de alimentador.

Ejemplo 1: Células madre pluripotentes humanas modificadas

[000103] Las células madre pluripotentes humanas (PSC) (NIH2, NIH3 y W1C1) se modificaron genéticamente para (i) interrumpir el gen B2M que da por resultado la anulación de la proteína HLA de clase I, y (ii) expresar un HLA-E de fusión de cadena individual exógena ("UDC I-PSC"). Las UDC I-PSC se modificaron genéticamente adicionalmente con una mutación suprimida de un gen relacionado con HLA de clase II, RFXANK, lo que dio por resultado la interrupción de la proteína HLA de clase II ("UDC I/II-PSC"). De manera alternativa, las UDC I-PSC o UDC I/II-PSC además se modificaron genéticamente para expresar un gen que codifica para un receptor Fc/CD16 ("FcR-UDC I-PSC" o "FcR-UDC I/II-PSC"). Las UDC I-PSC, UDC I/II-PSC y/o FcR-UDC I-PSC se conocen colectivamente en la presente como "UDC PSC". Las células diferenciadas se mencionan en la presente como, por ejemplo, "FcR-UDC I-NK" o "FcR-UDC I/II-NK".

Ejemplo 2: Diferenciación de NK de células madre pluripotentes humanas modificadas y parentales

[000104] Las UDC PSC parentales y modificadas

(colectivamente, "PSC") se descongelaron, expandieron, y cultivaron en medios libres de componentes animales, libres de alimentador, sin mTeSR^{MR} (STEMCELL Technologies, Cambridge, MA) durante hasta siete días con vitronectina. Las PSC se

5 disociaron en células individuales y se transfirieron a placas de micropocillo y se cultivaron en medio STEMdiff^{MR} APEL^{MR}2 y Gibco^{MR} PFHM-II (STEMCELL Technologies, Cambridge, MA; ThermoFisher Scientific, Waltham, MA) durante catorce días para diferenciarse en células precursoras (mediante

10 cuerpos embrioides) capaces de diferenciarse en tipos de células hematopoyéticas, tipos de células endoteliales, y/o derivados mesodérmicos. El medio se complementó con BMP4 (20 ng/mL), VEGF (20 ng/mL) y SCF (40 ng/mL). Los cambios de la mitad del medio se realizaron cada dos días a partir del día

15 3. Los cuerpos embrioides se volvieron a fijar en placas en matraces T75 recubiertos con DLL4/Retronectina para diferenciarse en células NK. Los cuerpos embrioides se cultivaron en condiciones libres de alimentador en medios de diferenciación que comprenden SCF (20 ng/mL), IL-7 (20

20 ng/mL), IL-15 (10 ng/mL), Flt3L (10 ng/mL), IL-3 (5 mg/mL) y UM171 35 nM durante 21 días en DMEM/F12 modificado. La mitad de los cambios de medios se realizaron dos veces por semana. Las células NK resultantes ("UDC-NK") se lavaron y recolectaron. Las células UDC-NK se activaron y expandieron

25 por el cultivo de las células UDC-NK en matraces recubiertos

con anticuerpos anti-NKp30, anticuerpos anti-DNAM-1 y Retronectina en medio CTS^{MR} NK-Xpander^{MR} o RPMI-1640 que comprende IL-15 (10 ng/mL), IL-18 (10 ng/mL) e IL-21 (10 ng/mL) durante tres días, después de lo cual las células UDC-
5 NK se transfirieron a un biorreactor de matraz de agitación o G-REX^{MR} y se cultivaron en presencia de IL-15 e IL-18 durante otros tres días. Un esquema representativo del proceso de diferenciación de NK se muestra en la figura 1.

[000105] El método produjo una población sustancialmente
10 homogénea de células UDC NK independientemente de la línea celular parental o UDC PSC modificadas. Comenzando con aproximadamente 4×10^6 iPSC, al comienzo del Paso 0 (como se ilustra en la figura 1), se produjeron aproximadamente 5×10^{10} de células NK, hasta una expansión de 10,000 veces. La
15 adición de UM171 mejoró el rendimiento de células UDC-NK durante la diferenciación de NK como se muestra en las figuras 2A-2C. Además, a través de múltiples ejecuciones de producción y clones editados por genes, al menos 90% de las células fueron positivas para CD56 y CD45 sin requerir
20 ninguna paso de purificación para remover los tipos de células no deseadas (ver figura 7A). Tanto UDC I-PSC como FcR-UDC I-PSC produjeron al menos 90% de células NK CD45⁺CD56⁺. Además, como se muestra en las figuras 3A y 3B, la activación y expansión de las células NK dio por resultado un
25 alto rendimiento celular consistente a través de la línea

celular PSC (NIH3 y W1C1) y clones editados por genes (UDC I-PSC, UDC I/II-PSC y FcR-UDC I-PSC).

[000106] Para la activación y expansión de la célula UDC-NK (paso 3 o paso (d)), se probaron combinaciones de agonistas de NK (ver la figura 4). También se probaron agonistas de NK individuales y mostraron una activación moderada de NK. Las células UDC-NK (paso 2) mostraron una expansión robusta y una alta viabilidad celular. Como se muestra en las figuras 5A-5B, a través de cuatro densidades de siembra de células diferentes, las células UDC NK (paso 2) cultivadas en Retronectina, anticuerpos anti-NKp30, anticuerpos anti-DNAM-1 con medios que comprenden IL-15, IL-18, e IL-21 demostraron más de 16 a 32 veces de expansión, en comparación al control del paso 2 que solo tuvo 3 a 4 veces de expansión, y más de 90% de viabilidad celular.

[000107] Un análisis del subconjunto de población celular e impurezas celulares al final del proceso de diferenciación de NK muestra niveles muy bajos de células T CD3+ y pocas, si las hay, PSC restantes. La tabla 1 proporciona los detalles de los subconjuntos/impurezas de la población de células.

Tabla 1

Fenotipo Celular	Tipo de célula	% de células que expresan		Lotes
		Media ± D.E.	Intervalo	

5	CD45+	Células hematopoyéticas	99.5 ± 0.8	98.0 – 99.9	5
	CD45+ CD56+	células NK	96.7 ± 1.8	93.9 – 98.7	5
	CD45+ CD56- CD11b+	Células mieloides	2.00 ± 0.70	1.14 – 2.87	5
	CD45+ CD56- CD15+	Granulocitos	0.50 ± 1.06	0.007 – 2.40	5
	CD45+ CD56- CD33+	Células de linaje mieloide	0.12 ± 0.09	0.04 – 0.27	5
10	CD45+ CD56- CD14+	Monocitos	0.02 ± 0.02	0.001 – 0.04	5
	CD45+ CD56- CD3+	Células T	0.01 ± 0.01	0.001 – 0.030	5
	CD45+ CD56+ CD3+	Posibles células NKT	0.14 ± 0.18	ND – 0.33	5
15	CD45+ CD56- CD19+	Células B	0.015 ± 0.010	0.001 – 0.030	5
	CD45+ CD56- CD34+	Células madre y progenitoras hematopoyéticas	0.011 ± 0.013	ND – 0.030	5
	SSEA3+ Tra-181+	PSC	0.0002 ± 0.0004	ND – 0.001	5

ND = no detectado

20

[000108] Las células UDC-NK de la invención fueron en promedio aproximadamente 18% más grandes en volumen en comparación a las células NK de sangre periférica (PB-NK) como se demuestra por citometría de flujo (ver figura 6).

25

Ejemplo 3: Caracterización *in vitro* de células NK derivadas de UDC PSC

[000109] Las células UDC-NK derivadas de UDC I-PSC, UDC I/II-PSC y UDC I-FcR-PSC expresaron el fenotipo celular
5 esperado en diferentes clones editados por genes. Como se muestra en la figura 7A, las células NK derivadas de UDC PSC y derivadas de UDC I-PSC tuvieron todas una alta positividad para CD45⁺CD56⁺. Las células NK derivadas de UDC I-PSC (células UDC I-NK) no expresaron HLA clase I, pero expresaron
10 HLA clase II y HLA-E, y niveles tipo silvestre de CD16 (FcR). Ver las figuras 7B-7E. Las células UDC-NK derivadas de FcR-UDC I-PSC (células FcR-UDC I-NK) tuvieron un perfil de expresión similar, excepto que expresaron niveles más altos de CD16 en comparación al tipo silvestre. Por último, las
15 células UDC I/II-PSC derivadas de UDC-NK (células UDC I/II-NK) no expresaron proteína HLA clase I o clase II, expresaron HLA-E y expresaron niveles tipo silvestre de CD16. Estos datos demuestran que las células NK derivadas de los clones editados por genes mantuvieron las ediciones de genes después
20 de la diferenciación de las PSC. El fenotipo celular esperado también se demostró en diferentes líneas celulares de PSC (NIH3 y W1C1) (ver las figuras 8A-8B). Con base al menos en lo anterior, el proceso de diferenciación de NK divulgado en la presente es sólido en diferentes clones editados por
25 genes, así como en líneas celulares de PSC.

[000110] Las células UDC-NK expresaron marcadores NK comunes y otros biomarcadores similares a PB-NK. Como se muestra en la figura 9C, los marcadores de NK comunes, por ejemplo, NKp30, NKp46, NKG2D, DNAM-1, 2B4, NKG2A y CD94, con algunas excepciones, se expresaron en células FcR-UDC I-NK (tanto el paso 2 como el paso 3 ilustradas en la figura 1, es decir, el paso (b) y (c), respectivamente) como células PB-NK expandidas (las células PB-NK se expandieron con el paso 3 del protocolo de diferenciación de NK). De manera similar, el marcador de células T CD8 se expresó comúnmente en células FcR-UDC I-NK y PB-NK expandida, pero no CD4, TCR $\alpha\beta$ o TCR $\gamma\delta$, y poca o ninguna CD3. Figura 9B. La falta de TCR $\alpha\beta$ desempeña una función importante en la seguridad.

[000111] Las células UDC-NK expresaron varios marcadores de activación y pocos, si los hay, marcadores de agotamiento o "tipo memoria". En las figuras 10A-10C, se midieron las células FcR-UDC I-NK (paso 2 y paso 3) y PB-NK expandida para la activación, agotamiento, y marcadores "tipo memoria". Aparte de CD69, los marcadores de activación fueron, en su mayor parte, similares entre las células FcR-UDC I-NK y PB-NK expandida. Las células I-NK FcR-UDC mostraron niveles más altos de CD69 en comparación a PB-NK expandida. A diferencia de PB-NK expandida, las células FcR-UDC I-NK mostraron pocos, si los hay, marcadores de agotamiento o "tipo memoria". La PB-NK expandida tuvo niveles más altos de marcadores de

agotamiento TIGIT, LAG3, KLRG1 e ILT2, y niveles más altos de marcador tipo memoria NKG2C. Se muestra la expresión diferencial de receptores de citocina y quimiocina (ver figuras 11A-11B) y marcadores de adhesión/direccionamiento, coestimuladores y apoptóticos (ver figuras 12A-12C) para células FcR-UDC I-NK y PB-NK expandida.

[000112] Las células UDC-NK también demostraron actividad de citotoxicidad celular natural (NCC) en múltiples corridas, clones editados por genes, y líneas celulares de PSC. Usando un ensayo de liberación de europio de 2 horas, se midió la actividad de NCC de células UDC-NK por su capacidad para aniquilar células diana tumorales K562. En la figura 13, se adicionaron 1×10^4 células tumorales K562-GFP por pocillo y se adicionó una cantidad correspondiente de células UDC-NK por la relación de E:T. Los resultados demuestran una actividad de NCC *in vitro* consistente y similar (es decir, lisis específica) de las células UDC-NK contra células tumorales K562 independientemente de la línea celular de PSC o clones editados por genes en múltiples corridas. Además, las células FcR-UDC I-NK exhibieron actividad de NCC similar a PB-NK expandida; al mismo tiempo, no se observó citotoxicidad ni fratricida contra células mononucleares de sangre periférica (PBMC) alogénicas normales o células FcR-UDC I-NK en sí mismas, respectivamente (ver figura 16). Sorprendentemente, estas células UDC-NK demostraron actividad

de NCC en serie contra células tumorales K562 tal que las células UDC-NK fueron capaces de aniquilar células tumorales K562 recién adicionadas de una manera dependiente de la dosis (ver la figura 17). El ensayo de destrucción en serie de

5 IncuCyte se realizó usando 1.5×10^4 (3:1 E:T) o 5×10^4 (10:1 E:T) células UDC-NK (FcR-UDC I-NK) (c.3C1). Cada 24 horas, se agregaron 5×10^3 células diana K562-GFP un total de 6 veces. Se tomaron imágenes de los pocillos cada 3 horas durante 6 días.

10 **[000113]** De manera similar a NCC, las células UDC-NK exhiben una potente citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) contra un amplio intervalo de líneas celulares tumorales CD20⁺. Usando un ensayo de ADCC basado en flujo de

15 4 horas, las células tumorales se marcaron con trazas de violeta celular y los anticuerpos se dosificaron a 1 µg/ml. Las células FcR-UDC I-NK mostraron un incremento en la actividad de ADCC junto con Rituximab contra tres (3) líneas celulares tumorales (Daudi, Ramos, y Raji) en comparación a un anticuerpo IgG1 de control (ver figuras 18A-18C). En

20 contraste, las células PB-NK expandidas más Rituximab no mostraron ningún incremento en la actividad de ADCC contra células tumorales Raji en comparación al anticuerpo de IgG1 de control (ver figura 18D). Además, las células FcR-UDC I-NK también demostraron actividad de NCC y ADCC contra un amplio

25 intervalo de líneas de células de linfoma B (ver figura 19).

Estos resultados demuestran la actividad de ADCC de células UDC-NK contra un amplio intervalo de líneas celulares de linfoma CD20⁺ y B.

[000114] Las células UDC-NK produjeron perfiles de citocinas
 5 indicativos de células NK activas capaces de inducir ADCC después de la estimulación con células tumorales Raji recubiertas con Rituximab. Usando un ensayo de secreción de citocinas estándar, se co-cultivaron 1×10^5 células FcR-UDC I-NK/pocillo con células tumorales Raji recubiertas con
 10 Rituximab en una relación de E:T de 1: 1 durante 25 horas. La secreción de citocinas se midió utilizando un inmunoensayo 15-Plex Cytokine Luminex (ver figura 20A). Además, las células FcR-UDC I-NK no elevaron la secreción de citocinas/quimiocinas después del co-cultivo con PBMC
 15 alogénicas que demuestran especificidad de las células FcR-UDC I-NK (ver figuras 20B-20E y 21A-21D).

Ejemplo 4: Persistencia y distribución de células NK derivadas de UDC-PSC *in vivo*

[000115] Las células UDC-NK también exhibieron persistencia
 20 *in vivo* en la sangre, bazo, y médula ósea en ausencia de antígeno. En ratones NSG, se inyectaron 4×10^6 células FcR-UDC I-NK (c.3C1) por vía intravenosa (i.v.) seguido por IL-2 (30,000 UI, 3x/semana) e IL-15 (100 ng, diariamente durante 7 días). Para cada tejido, el porcentaje de células FcR-UDC I-
 25 NK dentro de linfocitos/WBC se determinó por citometría de

flujo y tinción para CD45 humana y CD56 humana. Los conteos de células totales se determinaron usando un método de citometría de flujo (por ml de sangre, por bazo, por células de BM en 2 fémures + 2 tibias), y el % de FcR-UDC I-NK se aplicó a este número para calcular el número de FcR-UDC I-NK en cada tejido. Como se muestra en las figuras 22A-22G, las células FcR-UDC I-NK persistieron *in vivo* en la ausencia de antígeno durante más de 10 días después de la inyección i.v. Además, las células FcR-UDC I-NK se distribuyeron a múltiples tejidos: pulmón > hígado > bazo > sangre > médula ósea (ver figuras 23A-23E).

Ejemplo 5: Estudios de eficacia antitumoral *in vivo* utilizando células UDC-NK en un modelo de tumor i.p. Raji

[000116] La eficacia de las células UDC-NK contra tumores *in vivo* se estudió en un modelo de tumor intraperitoneal (i.p.) de Raji. En un estudio representativo, los ratones NSG se dividieron en seis grupos (n = 7 u 8) como se muestra en la tabla 2 a continuación.

Tabla 2

Grupo Núm.	Tratamiento
1	No tratado
2	Rituximab solo
3	Células FcR-UDC-NK solas

4	PB-NK expandida sola
5	Células FcR-UDC-NK + Rituximab
6	PB-NK expandida + rituximab

5

[000117] En la figura 24, los ratones NSG se irradiaron y se inyectaron i.p. con células Raji (linfoma de Burkitt) (3×10^5 células). Las células Raji son resistentes a las células NK en la ausencia de un anticuerpo anti-CD20. En el día

10 cuatro, se administraron 5×10^6 células I-NK de FcR-UDC y/o Rituximab (300 μ g) a los ratones NSG. En el día 7, se administró una segunda dosis de Rituximab (300 μ g). A los ratones NSG se les administraron dosis diarias de IL-15 (100 ng) durante 7 días, y se les administró IL-2 (30,000 UI)

15 3x/semana durante 3 semanas. Se formaron en imagen de ratones NSG y se evaluaron para determinar la supervivencia, BLI (carga tumoral), y peso corporal y otras condiciones de salud en varios días hasta el día 121. Como se muestra en las figuras 25A-25B, la combinación de FcR-UDC I-NK y Rituximab

20 prolongó significativamente la supervivencia de ratones NSG portadores de linfoma, más allá de la observada usando células Rituximab o FcR-UDC I-NK solas (ver figura 25A). La eficacia fue similar entre las células FcR-UDC I-NK más Rituximab y las células PB-NK más Rituximab (ver figura 25B).

25

Sin embargo, la tasa de respuesta fue de aproximadamente 50%.

[000118] En otro estudio, los ratones se dividieron en cinco grupos (n = 8) como se muestra en la tabla 3 a continuación.

Tabla 3

5

10

15

Grupo Núm.	Tratamiento
1	No tratado
2	Rituximab solo (Día 2)
3	Células FcR-UDC-NK solas (día 2, 6 y 10)
4	Células FcR-UDC-NK + Rituximab (Día 2) y células FcR-UDC-NK solas (Día 6 y 10)
5	Células FcR-UDC-NK + Rituximab (Día 2) + células FcR-UDC-NK solas (Día 10 y 16)

20

25

[000119] En la figura 26, los ratones NSG se irradiaron y se inyectaron i.p. con células Raji (linfoma de Burkitt) (2×10^5 células). En el día 2, se administraron 10×10^6 células I-NK de FcR-UDC y/o 100 μ g de Rituximab a los ratones. En el día 6, 10 y/o 16, se administraron 10×10^6 células FcR-UDC I-NK i.p. a los ratones. A los ratones se les administraron dosis diarias de IL-15 (100 ng) e IL-2 (30,000 UI) 3x/semana desde el día 2 hasta los 21 días posteriores a la última dosis de NK. Se formaron en imagen de ratones NSG y se

evaluaron para determinar la supervivencia, BLI (carga tumoral), y peso corporal y otras condiciones de salud en varios días hasta el día 86. FcR-UDC I-NK y Rituximab prolongaron significativamente la supervivencia de ratones portadores de linfoma, más allá de la observada usando células Rituximab o FcR-UDC-NK solas (ver figura 27B). Todos los ratones tratados con FcR-UDC-NK más Rituximab respondieron al tratamiento y el incremento del intervalo entre dosis prolongó la duración de la respuesta (ver figura 27A).

Ejemplo 6: Estudios de eficacia antitumoral *in vivo* utilizando células UDC-NK en un modelo de tumor i.v. Raji

[000120] La eficacia de las células UDC-NK contra tumores *in vivo* se estudió en un modelo de tumor i.v. Raji. El modelo i.v. de Raji es un modelo más agresivo y diseminado y representa un modelo fisiológico de linfoma más clínicamente pertinente. En un estudio representativo usando ratones NOGf (FcResolv NOG) que tienen FcγR de ratón suprimido, los ratones NOGf se dividieron en tres grupos como se muestra en la tabla 4 a continuación.

Tabla 4

Grupo Núm.	Tratamiento	núm. de ratones
1	No tratado	8
2	Rituximab solo (días	8

	1, 8, 15)	
3	Células FcR-UDC-NK + Rituximab (Días 1, 8 y 15) y células FcR- UDC-NK solas (Día 4)	8

5

[000121] En la figura 28A, los ratones NOGf se inyectaron i.v. con células Raji (1×10^5 células), en el día 1 con Rituximab (100 μ g, i.p.) o en combinación con células FcR-UDC I-NK (10×10^6 , i.v.). En el día 8 y 15 se administraron células I-NK de Rituximab solas (100 μ g, i.p.) o en combinación con FcR-UDC (10×10^6 , i.v.) a los ratones. Para el grupo 3, se administraron células FcR-UDC I-NK solas (10×10^6 , i.v.) a los ratones el día 4. A los ratones se les administraron dosis diarias de IL-15 (100 ng, i.p.). Como se muestra en la figura 28B, la combinación de FcR-UDC I-NK más Rituximab logró una reducción significativamente mayor de la carga tumoral en comparación a Rituximab solo, así como sin tratamiento.

10

15

[000122] En otro estudio, los ratones se dividieron en cuatro grupos ($n = 8$) como se muestra en la tabla 5 a continuación.

20

Tabla 5

Grupo Núm.	Tratamiento	núm. de ratones
1	No tratado	8

25

5

10

2	Rituximab solo (días 1, 8, 11)	8
3	Células I-NK de FcR-UDC 3M + Rituximab (Días 1, 8 y 11) y células FcR-UDCI-NK 3M solas (Día 4)	8
4	Células FcR-UDC I-NK 15M + Rituximab (Días 1 y 11), células FcR-UDC I-NK 15M solas (Día 4) y Rituximab solo (Día 8)	8

15

20

[000123] En la figura 29A, los ratones NOGf modificados para expresar IL-15 humana se inyectaron i.v. con células Raji (1×10^5 células), en el día 1 con Rituximab solo (100 μ g, i.p.) o en combinación con células FcR-UDC I-NK (3×10^6 o 15×10^6). En el día 4, se administraron células FcR-UDC I-NK solas (3×10^6 o 15×10^6 , i.v.). En el día 8 y 11, se administró Rituximab solo (50 μ g, i.p.) o se administró en combinación con 3×10^6 células FcR-UDC I-NK (i.v.), o en el día 11 se administró Rituximab en combinación con 15×10^6 células FcR-UDC I-NK (i.v.). Como se muestra en la figura 29B, la combinación de 15×10^6 células FcR-UDC I-NK + Rituximab logró la mayor reducción en la carga tumoral.

25

[000124] Ejemplo 7: Estudios de eficacia antitumoral

utilizando células UDC-NK y un anticuerpo anti-claudina 6 (CLDN6)

[000125] Se evaluó la citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC) usando las células UDC-NK descritas en la presente en combinación con anticuerpos anti-CLDN6 contra la línea celular de cáncer de ovario CLDN6+ PA-1. En resumen, en un ensayo de ADCC basado en flujo de cuatro horas, las células PA-1 marcadas con violeta de CellTrace se co-cultivaron con células FcR-UDC I-NK en la presencia de concentraciones tituladas de anticuerpos anti-CLDN6, ASP1650 (también conocido como IMAB027) y mAb de ASP1893. Como se muestra en la figura 30, las células FcR-UDC I-NK demostraron citotoxicidad mejorada contra células PA-1 de una manera dependiente de la dosis de anticuerpo anti-CLDN6. La EC50 usando el anticuerpo ASP1893 mAb (IgG1 humanizada) fue de aproximadamente 4.32 ng/mL, y la EC50 usando el anticuerpo ASP1650 (IgG1 quimérica) fue de aproximadamente 8.49 ng/mL.

[000126] También se probó un panel de línea de células tumorales para la expresión de CLDN6 de superficie y se clasificó en grupos CLDN6hi, CLDN6mid, CLDN6low y CLDN6-. Las células FcR-UDC I-NK se probaron en un ensayo de ADCC basado en flujo de cuatro horas contra un panel de líneas celulares tumorales con niveles variables de CLDN6 de superficie. Como se muestra en las figuras 31A-31M, las células FcR-UDC I-NK demostraron actividad de ADCC contra células tumorales CLDN6+

de una manera dependiente de la expresión de CLDN6. De manera interesante, las células FcR-UDC I-NK mostraron citotoxicidad natural (NCC) sin anticuerpos anti-CLDN6 contra un amplio intervalo de líneas celulares tumorales, independientemente de la expresión de superficie de CLDN6.

[000127] También se examinó la producción de TNF- α e IFN- γ por células UDC-NK después de la estimulación con células tumorales recubiertas con anticuerpo anti-CLDN6. En resumen, se co-cultivaron 10^5 células FcR-UDC I-NK y 10^5 células tumorales en una placa de 96 pocillos en la presencia o ausencia de 1 μ g/mL de anticuerpo anti-CLDN6 (mAb ASP1893) o anticuerpo de hIgG1 de control. 24 horas después del cocultivo, los sobrenadantes de cultivo se recolectaron para las mediciones de TNF- α e IFN- γ mediante ELISA (R&D Systems). Las figuras 32A-32B muestran que las células FcR-UDC I-NK exhibieron secreciones elevadas de TNF- α e IFN- γ después de la estimulación con un panel de líneas de células tumorales en comparación a los niveles de citocinas basales sin estimulación. Las células FcR-UDC I-NK demostraron una producción de citocinas superior después de la estimulación con células tumorales CLDN6+ y mAb ASP1893.

[000128] La eficacia de las células UDC-NK contra tumores *in vivo* se estudió en un modelo de tumor de ratón de xenoinjerto de células CLDN6+ PA-1. En un estudio representativo, los

ratones se dividieron en cuatro grupos ($n = 6$ o 7) como se muestra en la tabla 6 a continuación. En resumen, se injertaron 5×10^6 células PA-1 en el flanco de ratones NOGf modificados para expresar IL-15 humana por vía subcutánea. 13 días después del injerto de tumor, los ratones se trataron con 7.5×10^6 células FcR-UDC I-NK crioconservadas i.v. con o sin anti-CLDN6 (300 μ g ASP1650) i.p. como se ilustra en la figura 33. Las células FcR-UDC-I-NK crioconservadas se descongelaron e inyectaron inmediatamente a los ratones. Las figuras 34A-34B muestran que el tratamiento de combinación con células FcR-UDC I-NK y anticuerpo anti-CLDN6 demostró una eficacia antitumoral estadísticamente significativa y una supervivencia general mejorada. La monoterapia de células FcR-UDC I-NK o anticuerpo anti-CLDN6 no mostró eficacia antitumoral significativa.

Tabla 6

Grupo Núm.	Tratamiento	Núm. de ratones
1	No tratado	7
2	Ab anti-CLDN6 solo	6
3	UDC-NK 7.5M	7
4	UDC-NK 7.5M + Ab anti-CLDN6	7

[000129] El ejemplo anterior demuestra que las células UDC-NK exhiben citotoxicidad natural *in vitro* sin anticuerpos

anti-CLDN6 contra un amplio intervalo de líneas de células tumorales, independientemente de la expresión de superficie de CLDN6. El ejemplo demuestra además que las células UDC-NK de la divulgación exhiben una potente actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo* cuando se usan junto con un anticuerpo anti-CLDN6.

[000130] En otro estudio, se empleó un modelo de tumor de ratón de xenoinjerto de células PA-1 usando ratones NOGf que expresan IL-15 humana. Como se ilustra en la figura 35A, se administraron 7.5×10^6 células FcR-UDC I-NK i.v. y/o se administró anticuerpo anti-CLDN6 (300 µg) i.p. El tratamiento de combinación de células FcR-UDC-NK y anticuerpo anti-CLDN6 dio por resultado la inhibición del crecimiento tumoral (figura 35B) y prolongó la supervivencia (figura 35C). Se observó una tasa de supervivencia mayor que 50% aproximadamente a los 50 días en ratones a los que se administraron células FcR-UDC I-NK + anticuerpo anti-CLDN6.

[000131] Ejemplo 8: Estudios antitumorales que utilizan células UDC-NK y un anticuerpo anti-claudina 18.2 (CLDN18.2)

[000132] Este ejemplo demuestra que las células UDC-NK demuestran actividad antitumoral cuando se utilizan en combinación con un anticuerpo anti-CLDN18.2, zolbetuximab. En resumen, los ensayos de ADCC se realizaron como un cocultivo de cuatro horas con células FcR-UDC I-NK y células diana tumorales BxPC3-CLDN18.2-Luc, similar al ensayo descrito en

el ejemplo 7. Zolbetuximab estaba presente a 1 mg/ml. Los resultados se ilustran en la figura 36A, que muestra la destrucción dependiente de zolbetuximab de células tumorales que expresan CLDN18.2. El efecto antitumoral de células FcR-UDC I/II-NK en combinación con anticuerpo anti-claudina 18.2 (Zolbetuximab) contra células tumorales BxPC3-CLDN18.2-Luciferasa se ilustra en la figura 36B, que demuestra que el nivel más alto de aniquilación celular se logró usando células FcR-UDC I/II-NK en combinación con Zolbetuximab.

[000133] También se realizó un ensayo de secreción de citocinas utilizando métodos similares a aquellos del ejemplo 7. Se cultivaron células BxPC3-CLDN18.2-Luc con células FcR-UDC I-NK de la divulgación, células FcR-UDC I-NK e IgG humana, o células FcR-UDC I-NK y zolbetuximab. Los sobrenadantes se recolectaron después de un co-cultivo de 24 horas en presencia de IL-15 (10 ng/mL), y se examinó el nivel de interferón-gamma o factor de necrosis tumoral-alfa. Zolbetuximab estaba presente a 1 mg/ml. Los resultados se ilustran en las figuras 37A-37B. La secreción de citocinas por células FcR-UDC I-NK aumentó considerablemente en muestras que comprenden zolbetuximab y células diana tumorales BxPC3-CLDN18.2-Luc.

[000134] Los ejemplos proporcionados en la presente establecen que las células NK modificadas de la divulgación exhiben actividad antitumoral contra un amplio intervalo de

tipos de tumores, incluyendo linfoma, cáncer de ovario, y
cáncer pancreático. Los ejemplos reportan que las células NK
exhiben actividad antitumoral sola, y la actividad
antitumoral se potencia por el uso de constructos de
5 anticuerpo contra antígenos tumorales (tal como CLDN6,
CLDN18.2, y CD20). En tanto que los ejemplos de trabajo
utilizaron células tumorales para demostrar la actividad de
aniquilación celular de las células NK modificadas de la
divulgación, se apreciará que los datos se pueden extrapolar
10 a tipos de células adicionales.

[000135] Todas las referencias, incluyendo publicaciones,
solicitudes de patente, y patentes, citadas en la presente se
incorporan por la presente como referencia al mismo grado
como si cada referencia se indicara individualmente y en
15 específico para que se incorporen como referencia y se
expongan en su totalidad en la presente.

20

25